

Aus der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Volk

**Eine Aktivierung von Melatoninrezeptoren verbessert das  
Überleben nach polymikrobieller Sepsis bei der Ratte.**

***Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin***

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2014

vorgelegt von: Martin Wolff

geboren am 28.08.1983 in St.Wendel

**1. Tag der Promotion:**

**2. Dekan:**

**3. Berichterstatter:**

## **Inhalt**

<b>1</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>11</b>
<b>4</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>13</b>
<b>4.1</b>	<b>Bedeutung der Sepsis</b>	<b>13</b>
<b>4.2</b>	<b>Definition der Sepsis</b>	<b>14</b>
<b>4.3</b>	<b>Pathophysiologie der Sepsis</b>	<b>17</b>
<b>4.4</b>	<b>Zytokine</b>	<b>17</b>
4.4.1	Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ )	18
4.4.2	Interleukin 6 (IL-6)	19
4.4.3	Interleukin 10 (IL-10)	19
<b>4.5</b>	<b>Therapieoptionen der Sepsis</b>	<b>20</b>
<b>4.6</b>	<b>Melatonin</b>	<b>21</b>
4.6.1	Protektive Eigenschaften von Melatonin	22
4.6.2	Antioxidative Wirkung	22
4.6.3	Rezeptor vermittelte Wirkung	23
<b>4.7</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>25</b>

<b>5</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>26</b>
<b>5.1</b>	<b>Material</b>	<b>26</b>
5.1.1	Versuchstiere	26
5.1.2	Chemikalien	26
<b>5.2</b>	<b>Methodik</b>	<b>27</b>
5.2.1	Versuchsaufbau	27
5.2.2	Versuchsprotokoll	30
<b>5.3</b>	<b>Hämodynamik und Blutgasanalyse</b>	<b>33</b>
<b>5.4</b>	<b>Untersuchungen zur Zytokinantwort</b>	<b>34</b>
5.4.1	Probenentnahme	34
5.4.2	Vollblutansätze	34
5.4.3	ELISA-Messung der Zytokinkonzentration	36
<b>5.5</b>	<b>Statistische Analyse</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>40</b>
<b>6.1</b>	<b>Überlebenszeit</b>	<b>40</b>
<b>6.2</b>	<b>Hämodynamische Werte</b>	<b>42</b>
<b>6.3</b>	<b>Blutgasanalyse BGA</b>	<b>44</b>
6.3.1	Laktat Werte	44
6.3.2	pH-Wert und Base Exzess	45
6.3.3	Hämoglobin Werte	48
<b>6.4</b>	<b>Zytokinbestimmung</b>	<b>49</b>
6.4.1	Die unstimulierte Zytokinantwort	49

6.4.2	Die stimulierte Zytokinantwort	55
<b>7</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>61</b>
<b>7.1</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>61</b>
7.1.1	Verbesserung der Überlebenszeit	61
7.1.2	Hämodynamik	64
7.1.3	Blutgasanalyse	66
7.1.4	Zytokine	68
<b>8</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNG</b>	<b>72</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>73</b>
<b>10</b>	<b>PUBLIKATIONEN</b>	<b>85</b>
<b>11</b>	<b>DANK</b>	<b>86</b>

## 1 Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	Alpha
Abb	Abbildung
ACCP	American College of Chest Physicians
ANOVA	One-way analyses of variance
ATP	Adenosintriphosphat
ATS	American Thoracic Society
$\beta$	Beta
BE	Base Excess
BGA	Blutgasanalyse
BiAS	Biometrische Analyse von Stichproben
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
°C	Grad Celsius
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CREB-1	cAMP response element-binding protein
CI	Konfidenz-Intervall
CLI	Zökum Ligatur und Inzision
cm	Zentimeter
CLP	Zökum Ligatur und Punktion
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DIVI	Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin
dl	Deziliter
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSG	Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V.
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent-assay
ESICM	European Society of Intensive Care Medicine
FiO <sub>2</sub>	Inspiratorische O <sub>2</sub> -Konzentration
g	Gramm

## Abkürzungsverzeichnis

GMP	Guanosinmonophosphat
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
ICD-10	International Classification of Diseases and Related Health Problems
Ig	Immunglobulin
ivIgGAM	Mit IgM-angereicherten Immunglobulinen
IL	Interleukin
i-mtNOS	Induzierbare mitochondriale NO-Synthase
i-NOS	Induzierbare NO-Synthase
i.v.	Intravenös
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kPa	Kilopascal
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
Lzn	Luzindole
µg	Mikrogramm
MAP	Mittleren arteriellen Druck
Mel	Melatonin
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
MODS	Multi organ dysfunction syndrome
MT	Melatoninrezeptor
n	Anzahl
NO	Sickstoffmonoxid
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
p-Wert	Probability value (Signifikanzwert)

## Abkürzungsverzeichnis

PaO <sub>2</sub>	Partialdruck des gelösten O <sub>2</sub> im Plasma
pg	Pikogramm
rhAPC	Rekombinantes aktiviertes Protein C
Rml	Ramelteon
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SD	Standardabweichung
Sham-Op	Schein-Operation
SIRS	Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
SIS	Surgical Infection Society
T0	Zeitpunkt vor Sepsisinduktion oder Scheinoperation
T1	Zeitpunkt 5 Stunden nach Sepsisinduktion oder Scheinoperation
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
vs.	Versus (verglichen mit)
z.B.	Zum Beispiel
ZT	Zeitgeberzeit
ZVK	Zentralvenösen-Katheters



## **2 Zusammenfassung**

### **Eine Aktivierung von Melatoninrezeptoren verbessert das Überleben nach polymikrobieller Sepsis bei der Ratte**

Das pineale Hormon Melatonin dient dem Organismus als Transmitter der photoperiodischen Information und besitzt darüber hinaus antioxidative Eigenschaften. Für Melatonin konnte in früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass dessen Gabe bei einem septischen Schock zu einer Protektion der untersuchten Zielorgane führte. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Melatoningabe zu einer Verminderung oxidativer Mechanismen bei septischen Ereignissen, einhergehend mit einer Reduktion von proinflammatorischen Zytokinen und der Stimulation von antiinflammatorischen Zytokinen, führte. Während die protektiven Eigenschaften des pinealen Hormons in der Vergangenheit vorwiegend durch die ausgeprägten antioxidativen Eigenschaften erklärt wurden, mehren sich derzeit die Hinweise, dass die Protektion Melatoninrezeptor abhängig sein könnte. Welchen Einfluss eine Melatoninrezeptoraktivierung durch das pineale Hormon Melatonin oder den Melatoninrezeptor-Agonisten Ramelteon, der selbst über kein antioxidatives Potential verfügt, auf das Überleben nach schwerer Sepsis bei der Ratte hat, wurde bisher noch nicht untersucht. Um auszuschließen, dass diese beiden Substanzen durch eine Melatoninrezeptor unabhängige Interaktion zu einer Beeinflussung der Überlebenszeit führen, wurde zusätzlich der Melatoninrezeptor-Antagonist Luzindole verabreicht. Da nach aktueller Datenlage die Modulation der Immunantwort durch Melatonin ein möglicher Erklärungsansatz für seine organprotektiven Eigenschaften darstellen könnte, wurden nach 5 Stunden Sepsis in Vollblutansätzen die native und durch LPS-Endotoxin stimulierte Reaktion von peripheren mononukleären Zellen gemessen.

Die Untersuchung wurde an männlichen Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt, die einer Zökum Ligatur und Inzision (CLI) unterzogen wurden und für einen Beobachtungszeitraum von 12 Stunden in Narkose verblieben. Nach

Sepsisinduktion wurden die Tiere entweder mit Vehikel, Ramelteon, Melatonin, Luzindole, Ramelteon+Luzindole oder Melatonin+Luzindole behandelt (jeweils 1,0 mg/kg i.v.). Als Kontrolle dienten scheinoperierte Tiere, bei denen eine Laparotomie durchgeführt wurde, jedoch keine Sepsis Induktion erfolgte.

Die mittlere Überlebenszeit nach Sepsisinduktion betrug bei unbehandelten Tieren 288 min. Nach Therapie mit Melatonin oder Ramelteon kam es zu einer signifikant verlängerten Überlebenszeit im Vergleich zur Kontrollgruppe (Sepsis/Ramelteon 502 min  $\pm$  36 SD; Sepsis/Melatonin 550 min  $\pm$  40 SD,  $p < 0.001$  vs. Sepsis/Vehikel 288 min  $\pm$  14 SD). Dieser Effekt konnte durch die zusätzliche Gabe von Luzindole vollständig antagonisiert werden (Sepsis/Lzn+Rml: 293 min  $\pm$  23 SD und Sepsis/Lzn+Mel: 334 min  $\pm$  24 SD jeweils  $p < 0,001$ ). Während des Beobachtungszeitraums zeigte sich nach Melatonin- und Ramelteontherapie ein signifikant stabiler Säure- Basenhaushalt und eine stabilere Hämodynamik. Dieser Effekt war auch durch Luzindole vollständig antagonisierbar. Die Analyse der unstimulierten und stimulierten Zytokinantwort, 5 Stunden nach Sepsisinduktion, zeigte signifikant erhöhte Konzentrationen für TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-10 ( $p < 0.05$  vs. Ausgangswerten und vs. zugehöriger Kontrollgruppe) in allen Sepsis-Gruppen. Dieser Effekt war unabhängig von der verwendeten Medikation.

Die beobachteten Ergebnisse legen nahe, dass eine Aktivierung von Melatoninrezeptoren durch Melatonin oder Ramelteon zu einer verlängerten Überlebenszeit nach polymikrobieller Sepsis bei der Ratte führt. Dieser Effekt ist durch den Melatoninrezeptoren-Antagonisten Luzindole vollständig antagonisierbar. Diese beobachtete Protektion scheint nicht maßgeblich von immunmodulatorischen Vorgängen beeinflusst zu sein.

### 3 Summary

#### **The activation of melatonin receptors improves survival after polymicrobial sepsis in rat**

The pineal hormone works in the organism like a transmitter in the photoperiodic system and also has anti-oxidative properties. The administration of melatonin showed protective properties for examined organs during septic shock before, as well as a reduction of oxidative damage, reduction of pro-inflammatory cytokines and stimulation of anti-inflammatory cytokines. Melatonin was supposed to improve survival after sepsis via antioxidative effects. Yet, recent evidence suggests that this protective capacity may also rely on melatonin receptor activation.

The influence of melatonin receptor activation via melatonin or the melatonin receptor antagonist ramelteon, which itself has no direct antioxidative properties, on survival after induction of severe sepsis has not been investigated yet. Luzindole was added as a melatonin receptor antagonist to exclude melatonin receptor independent interaction to survival. Immune response modulation via melatonin was thought to be responsible for the organ protective properties, therefore the immune response of peripheral mononuclear cells was measured in whole blood cultures.

We used male Sprague-Dawley rats. The animals underwent cecal ligation and incision (CLI) and remained anesthetized for evaluation of survival for 12 hours. After induction of sepsis, animals were treated with vehicle, ramelteon, melatonin, luzindole, ramelteon+luzindole or melatonin+luzindole (each 1.0 mg/kg intravenously); corresponding sham controls underwent laparotomy but not CLI. The mean survival time for animals without treatment was 288 min. Administration of ramelteon or melatonin significantly improved mean survival time, compared to vehicle controls (sepsis/ramelteon  $502 \pm 36$  min and sepsis/melatonin  $550 \pm 40$  min; both  $p < 0.001$  vs. sepsis/vehicle  $288 \pm 14$  min). This effect was completely antagonized by co-administration of luzindole (each  $p < 0.001$ ). While the experiment melatonin and ramelteon treated animals showed significantly constant acid-base

balance and constant hemodynamic values. This effect was also abolished by the co-administration of luzindole. The analyses of unstimulated and stimulated cytokine response showed significantly elevated concentrations of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 ( $p < 0.05$  vs. baseline and vs. corresponding sham group) five hours after sepsis induction. This effect was independent from the used medication.

The study shows that the activation of melatonin receptors with melatonin or ramelteon leads to improved survival time after polymicrobial sepsis in rat. The beneficial properties were antagonized by the co-administration of the melatonin receptor antagonist luzindole. This effect appears to be independent from major immunological alterations.

## 4 Einleitung

### 4.1 Bedeutung der Sepsis

Auch heute noch ist die Sepsis weltweit, trotz moderner Behandlungsmethoden und unzähliger Antibiotika, eine der häufigsten Todesursachen. Das vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderte und 2001 gegründete Kompetenznetzwerk Sepnet führte im Jahre 2003 eine prospektive Querschnittsstudie auf 454 Intensivstationen in 310 Krankenhäusern durch. Anhand dieser Studie konnte gezeigt werden, dass in diesem Jahr in Deutschland 75 000 Einwohner (110 von 100 000) an einer schweren Sepsis bzw. einem septischen Schock und 79 000 (116 von 100 000) an einer Sepsis erkrankten. Von diesen insgesamt 154000 Patienten verstarben 57 000. Damit stellte die Sepsis neben den koronaren Herzerkrankungen und dem akuten Myokardinfarkt die dritthäufigste Todesursache in Deutschland dar [1].

Nach Daten des statistischen Bundesamtes für das Jahr 2011, die auf ICD-10 (International Classification of Diseases and Related Health Problems) Kodierungen der deutschen Krankenhäuser beruhen, lag die Sepsis bei den 100 häufigsten Todesursachen im Jahr 2011 auf Rang 28 mit knapp 7400 Toten. Wenn man bedenkt, dass sie im Jahr 1998 noch auf Rang 50 mit nur 3500 Toten lag, zeigt dies eine weiterhin ansteigende Mortalität.

Auch Patienten, die die Sepsis überleben, können größtenteils nicht als geheilt betrachtet werden, denn der ursprüngliche Gesundheitszustand kann nur in weniger als 50% wieder erreicht werden. Das frühere, normale Leben und die damit verbundene Lebensqualität sind nach überstandener Erkrankung weiterhin massiv eingeschränkt. Um diese weitestgehend wieder herzustellen, benötigt man langwierige ambulante Behandlungen durch verschiedene Fachärzte, teure Medikamente und Rehabilitationsmaßnahmen. Diese Folgebehandlungen sind sehr kostenintensiv. Kosten, die von der gesamten Gesellschaft getragen werden und diese in Höhe von Milliardenbeträgen belasten [2]. Dabei verursacht die intensivmedizinische Behandlung schwer kranker Patienten mit Sepsis bereits pro

Jahr direkte Kosten von 1,77 Milliarden Euro. Das sind 30% des intensivmedizinischen Budgets [3].

### **4.2 Definition der Sepsis**

Die Sepsis wird definiert als das Vorhandensein (vermutet oder nachgewiesen) einer Infektion in Verbindung mit einer systemischen Manifestation der Infektion [4].

**Infektion, nachgewiesen oder vermutet, und Folgendes:**

**Allgemeine Variable:**

- Fieber ( $> 38,3^{\circ}\text{C}$ )
- Hypothermie (Kerntemperatur  $< 36^{\circ}\text{C}$ )
- Herzfrequenz  $> 90/\text{min}$  oder mehr als zwei SD über dem für das Alter normalen Wert
- Tachypnoe
- Veränderter Geisteszustand
- Signifikante Ödeme oder positiver Flüssigkeitshaushalt ( $> 20 \text{ ml/kg}$  über 24 Std.)
- Hyperglykämie (Plasmaglukose  $> 140 \text{ mg/dl}$  oder  $7,7 \text{ mmol/l}$ ) ohne Diabetes

**Inflammatorische Variable:**

- Leukozytose (WBK-Zählung  $> 12,000/\mu\text{l}$ )
- Leukopenie (WBK-Zählung  $< 4000/\mu\text{l}$ )
- Normale WBK-Zahl mit mehr als 10 % unreifen Formen
- Plasma C-reaktives Protein mehr als zwei SD über dem Normalwert
- Plasma-Procalcitonin mehr als zwei SD über dem Normalwert

**Hämodynamische Variable:**

- Arterielle Hypotonie (SBP  $< 90 \text{ mm Hg}$ , MAP  $< 70 \text{ mm Hg}$  oder ein SBP-Rückgang  $> 40 \text{ mm Hg}$  bei Erwachsenen oder weniger als zwei SD unter dem Normalwert für das Alter)

**Variable der Organ-Dysfunktion:**

- Arterielle Hypoxämie ( $\text{Pao}_2/\text{Fio}_2 < 300$ )
- Akute Oligurie (Urinausscheidung  $< 0,5 \text{ ml/kg/h}$  für mindestens 2 Std. trotz adäquater Flüssigkeitstherapie)
- Kreatinin-Anstieg  $> 0,5 \text{ mg/dl}$  oder  $44,2 \mu\text{mol/l}$
- Koagulationabnormalitäten (INR  $> 1,5$  oder aPTT  $> 60 \text{ s}$ )
- Ileus (fehlende Darmgeräusche)
- Thrombozytopenie (Thrombozytenzahl  $< 100.000/\mu\text{l}$ )
- Hyperbilirubinämie (Gesamt-Plasma-Bilirubin  $> 4 \text{ mg/dl}$  oder  $70 \mu\text{mol/l}$ )

**Variable der Gewebepfusion:**

- Hyperlaktatämie ( $> 1 \text{ mmol/l}$ )
- Verminderte Rekapillarisation oder Marmorierung

**Tabelle 1: Diagnostische Kriterien für Sepsis**

SD = Standardabweichung, WBK = weiße Blutkörperchen, SBP = systolischer Blutdruck, MAP = mittlerer arterieller Druck,  $\text{Pao}_2$  = Partialdruck des Sauerstoffs im Blut,  $\text{Fio}_2$  = inspiratorischer Sauerstoffanteil, INR = International Normalized Ratio (Gerinnungsaktivität), aPTT = partielle Thromboplastinzeit.

Frei nach Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med 2003; 31:1250–1256. Aus der Deutschen Übersetzung durch ESICM von [5].

Zur Diagnosesicherung einer Sepsis ist kein Erregernachweis erforderlich, da dieser, abhängig von einer antibiotischen Vorbehandlung, nur in ca. 30 % der Fälle gelingt [6, 7, 8, 9, 10]. Im klinischen Alltag unterscheidet man zwischen Sepsis, schwerer Sepsis und dem septischen Schock.

**Schwere Sepsis** = Sepsis-induzierte Hypoperfusion oder organische Dysfunktion (jedes der folgenden Symptome gilt als durch Infektion verursacht)

Sepsis-induzierte Hypotonie  
Laktatwert über der normalen Labor-Obergrenze  
Urinausscheidung < 0,5 ml/kg/h für mehr als 2 Std. trotz adäquater Flüssigkeitstherapie  
Akutes Lungenversagen mit  $Pao_2/Fio_2 < 250$  ohne Lungenentzündung als Infektionsquelle  
Akutes Lungenversagen mit  $Pao_2/Fio_2 < 200$  mit Lungenentzündung als Infektionsquelle  
Kreatinin > 2,0 mg/dl (176,8  $\mu\text{mol/l}$ )  
Bilirubin > 2 mg/dl (34,2  $\mu\text{mol/l}$ )  
Thrombozytenzahl < 100.000/ $\mu\text{l}$   
Koagulopathie (Gerinnungsaktivität > 1,5)

### Tabelle 2. Diagnostische Kriterien für schwere Sepsis

$Pao_2$  = Partialdruck des Sauerstoffs im Blut,  $Fio_2$  = inspiratorischer Sauerstoffanteil.

Frei nach Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med 2003; 31:1250–1256. Aus der Deutschen Übersetzung durch ESICM von [5].

Ein septischer Schock wird definiert als das Vorhandensein eines akuten Kreislaufversagens mit persistierender arterieller Hypotension, die nicht durch andere Ursachen erklärt werden kann. Die Hypotension wird definiert als ein systolischer arterieller Blutdruck unter 90 mmHg, ein MAP < 60 oder eine Reduktion > 40mmHg vom Ausgangswert des systolischen Blutdrucks trotz adäquater Volumengabe [4].

Zwischen diesen drei "Krankheitszuständen" bestehen keine festen Grenzen, da sie fließend ineinander übergehen können. Sie werden vielmehr dem jeweiligen Patienten anhand seiner Vitalparameter, Laborwerte, hämodynamischen Daten und Organfunktionen zugeordnet [2].



### **4.3 Pathophysiologie der Sepsis**

Bisher sind bei weitem nicht alle, aber immerhin einige der wichtigen Mechanismen in der Pathophysiologie der Sepsis bekannt [11]. Nach Invasion durch verschiedenste Erreger (Bakterien, Pilze, Viren oder Parasiten) kommt es durch die körperfremden Epitope zur Stimulation immunkompetenter Zellen, die zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-6 (IL-6) oder Interleukin-1 (IL-1), angeregt werden. Diese Mediatoren der primären Immunantwort führen selbst zur Ausschüttung weiterer proinflammatorischer Zytokine. Unter physiologischen Bedingungen kommt es jedoch normalerweise mit der Aktivierung proinflammatorischer Stoffe auch zur Aktivierung antiinflammatorischer Stoffe wie z.B. der Zytokine Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-10 (IL-10), löslicher TNF- $\alpha$ -Rezeptoren und IL-1 Rezeptorantagonisten. Die genauen Wechselwirkungen zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen in der Sepsis sind momentan Gegenstand zahlreicher Untersuchungen und deren Beeinflussung des Krankheitsverlaufs ist noch nicht vollständig geklärt.

### **4.4 Zytokine**

Zytokine sind Botenstoffe, die ihre Wirkung, im Gegensatz zu Hormonen, auf sehr viel kürzeren Distanzen, auf parakrinem oder autokrinem Weg, vermitteln. Es sind einfache lösliche Polypeptide oder Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 15-25 kDa. Verschiedenste Zelltypen können Zytokine produzieren, wobei sie hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen freigesetzt werden. Dabei spielen sie eine wichtige Rolle bei der Regulation des Immunsystems und ermöglichen es, dem Organismus pathogene Keime wirkungsvoll zu bekämpfen, ohne sich dabei selbst zu schädigen. Nach ihrer biologischen Funktion werden sie in 4 Untergruppen unterteilt: Wachstumsfaktoren, Interleukine, Interferone und Chemokine. Nach einem auslösenden Reiz können sie schnell synthetisiert und sezerniert werden. Bei Konzentrationen, die sich im pico- bis nanomolaren Bereich befinden, zeigen sie regulierende Funktionen auf die Proliferation, Differenzierung, Migration oder Apoptose von Zielzellen. Zytokine können sich in ihrer Synthese untereinander, aber

auch in ihrer Wirkung additiv, synergistisch oder antagonistisch beeinflussen [12]. Die Zusammenhänge über die Freisetzung der Zytokine, ihrer komplexen Wechselwirkung untereinander und ihrer Einflüsse auf das differenzierte Immunsystem, sind auch heutzutage noch nicht komplett verstanden. Eingriffe in den Organismus durch Trauma oder das Eindringen von Bakterien führen zur Aktivierung mononukleärer Zellen, die Zytokine auszuschütten und damit in der Lage sind den Entzündungsprozess mittels proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- $\alpha$  und IL-6, weiter voran zu treiben. Die immunsuppressive Phase, die zeitlich nach einem septischen Ereignis auftritt, macht den Organismus anfällig für eine Zweitinfektion [13]. Eine gute Reaktionsfähigkeit von mononukleären Zellen des peripheren Blutes auf einen *second hit* würde dementsprechend für eine bessere Prognose sprechen.

Die Zytokine TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor-alpha), IL-6 (Interleukin-6) und IL-10 (Interleukin-10) wurden bei den folgenden Untersuchungen einmal mit und einmal ohne Stimulation durch ein Lipopolysaccharid (LPS) im Vollblutansatz gemessen und werden im folgenden näher erläutert.

### 4.4.1 Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ )

TNF- $\alpha$  ist einer der bedeutendsten Mediatoren der proinflammatorischen Zytokinantwort und an lokalen und systemischen Entzündungsprozessen beteiligt. Er kann Tumorzellen nekrotisieren. Seine Wirkung entfaltet er über die Stimulation TNF- $\alpha$  spezifischer Rezeptoren an der Oberfläche der Zielzellen. In der Folge werden eine Vielzahl weiterer proinflammatorischer Zytokine ausgeschüttet, wodurch schließlich der Entzündungsprozess aufrecht erhalten wird [14]. Unter physiologischen Bedingungen kommt es neben einem vermehrten Anstieg von TNF- $\alpha$  gegenregulatorisch auch zu einer vermehrten Ausschüttung löslicher TNF- $\alpha$  Rezeptoren, die das proinflammatorische Zytokin durch Bindung unwirksam machen können. Zusätzlich wird auch die antiinflammatorische Zytokinantwort stimuliert, beispielsweise durch eine vermehrte Bildung von IL-10 [15].

Mononukleäre Zellen werden zur vermehrten Ausschüttung von TNF- $\alpha$ , unter anderem durch LPS oder bakterielle Infektionen angeregt [12]. Durch seine Freisetzung kann es zu einem Anstieg der Körpertemperatur, bis hin zum Fieber

kommen [12]. Bei Patienten im septischen Schock ist eine deutlich erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentration nachweisbar [16]. Auf lokaler Ebene sind erhöhte Spiegel wichtig, um den Entzündungsprozess einzudämmen. Sie korrelieren in tierexperimentellen Studien sogar mit dem Outcome [17]. Kommt es jedoch zu einer Überproduktion mit einem massiven Übertritt in den Körperkreislauf, kann TNF- $\alpha$  eine sepsisähnliche Symptomatik auslösen [18], woraus ein Multiorganversagen und schließlich der Tod resultieren kann [19].

### **4.4.2 Interleukin 6 (IL-6)**

IL-6 ist ein hauptsächlich proinflammatorisches Zytokin und ähnelt TNF- $\alpha$  in seiner Funktion und Wirkungsweise. Nach Bakteriämie oder Verletzungen kommt es zu einer vermehrten Freisetzung dieses Zytokins. Dabei stellen mononukleären Zellen, Leber und Milz Hauptsyntheseorte für IL-6 und TNF- $\alpha$  dar [20]. Erhöhte Konzentrationen von IL-6 konnten bei Patienten festgestellt werden, die einen septischen Schock hatten [21, 22]. Ebenso konnte bei Patienten 1-3 Stunden nach einem elektiven operativen Eingriff erhöhte IL-6 Konzentrationen nachgewiesen werden, die erst nach 48-72 Stunden wieder abfielen, insofern keine Komplikationen auftraten [23].

Wie TNF- $\alpha$ , kommen auch IL-6 suppressive Funktionen im Immunsystem zu, indem es z.B. zu einer Verminderung der Zytokinfreisetzung mononukleärer Zellen und zu einer Hemmung bestimmter T-Helferzellen führt [24]. Laut Fischer et al. greift IL-6 auch in den Hormonhaushalt ein und führt zu einer vermehrten Ausschüttung von Kortison, Somatotropin, Glucagon und Adrenalin [25].

IL-6 ist ein etablierter, immunologischer Parameter, der Auskunft über Erkrankungszustand und Prognose geben kann. Dabei sind nicht die Spitzen-Spiegel, sondern deren Verlauf für eine prognostische Einschätzung ausschlaggebend [26].

### **4.4.3 Interleukin 10 (IL-10)**

IL-10 ist ein antiinflammatorisches Zytokin, welches vorwiegend von Monozyten, Makrophagen, B- und T-Lymphozyten freigesetzt wird. Auch IL-10 obliegen wichtige

Funktionen in der Steuerung immunologischer Prozesse. Im Gegensatz zu TNF- $\alpha$  und IL-6 hat es vor allem antiinflammatorische und immunsuppressive Wirkungen [27]. Daher ist IL-10 wichtig, um den Körper vor hyperreagiblen, sich selbst schädigenden, Immunreaktionen zu schützen, da es die Fähigkeit besitzt, die Immunantwort zu beenden [28]. Durch Aktivierung IL-10-spezifischer membranständiger Rezeptoren kann die Genexpression verschiedener proinflammatorischer Zytokine (z.B. TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1, IL-12) negativ beeinflusst werden. Der exakte Ablauf ist jedoch noch Gegenstand der Forschung [28]. Weiterhin fördert IL-10 auch die Ausschüttung antiinflammatorischer Substanzen [29], indem es z.B. eine vermehrte Produktion von Antagonisten des IL-1 Rezeptors (IL-1ra) stimuliert [30]. Ebenso kann es auch die entzündungserhaltende Wirkung von TNF- $\alpha$  stoppen, indem es die Bildung freier TNF- $\alpha$ -Rezeptoren fördert. IL-10 besitzt nicht nur hemmende Eigenschaften auf die Immunabwehr. Das Zytokin kann auch Mastzellen zu vermehrter Proliferation und Immunglobulinsekretion anregen [31] und die Ausdifferenzierung zytotoxischer T-Lymphozyten fördern [32].

## 4.5 Therapieoptionen der Sepsis

Die Basistherapie der Sepsis besteht aus einer Fokussanierung und einer antimikrobiellen Therapie. Neben dieser Basistherapie können nach den aktuellen S-2k Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI) [2] supportive und adjunktive Therapiemaßnahmen empfohlen werden. Bei den supportiven Therapieoptionen handelt es sich um eine adäquate hämodynamische Therapie durch Volumen-, Inotropika- und Vasopressoren-Gabe. Ebenso wie die Verwendung von Nierenersatzverfahren nach dem Eintritt eines akuten Nierenversagens; sowie eine frühzeitige Beatmung bei Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock, um die oximetrische Sauerstoffsättigung bei über 90% zu halten [33]. Aufgrund der weiterhin hohen Letalität der Sepsis, wurden in den letzten Jahrzehnten große Anstrengungen unternommen, adjunktive Therapieansätze zusätzlich zur kausalen und supportiven Therapie der Sepsis zu etablieren. Von der Vielzahl der untersuchten Medikamente haben jedoch nur wenige Einzug in den

klinischen Alltag gefunden. So kann bei septischen Patienten eine Therapie mit IgM-angereicherten Immunglobulinen (ivlgGAM) oder Selen erwogen werden [2]. Ebenfalls wurde das zuvor vielversprechende rekombinante aktivierte Protein C (rhAPC) mit dem Handelsnamen Xigris mangels Wirksamkeit wieder vom Markt genommen [34]. Die Suche nach weiteren adjunktiv einsetzbaren Medikamenten für die Sepsistherapie bleibt Gegenstand aktueller Forschungen. So stellt das pineale Hormon Melatonin aufgrund seiner protektiven Eigenschaften in der Sepsis ein vielversprechendes adjunktives Medikament dar [35]. Das körpereigene Hormon Melatonin und seine möglichen therapeutischen Eigenschaften werden in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

### **4.6 Melatonin**

Melatonin (5-Methoxy-N-Acetyltryptamin) wurde im Jahre 1958 durch Aaron Lerner entdeckt und kommt in vielen verschiedenen Tierarten, von Insekten bis zu einzelligen Organismen [36], sowie in Pflanzen und Pilzen vor [37]. Das Hormon Melatonin wird beim Menschen hauptsächlich in der Zirbeldrüse gebildet. Aufgrund seiner schlafanstoßenden Wirkung, ist seine Ausschüttung für die Regulation des zirkadianen Rhythmus und zur Steuerung der sogenannten "inneren Uhr" mit einem Tag- und Nacht-Rhythmus von zentraler Bedeutung. Im Rahmen von äußeren Einflüssen kann es zu veränderten Melatoninspiegeln im Organismus kommen. Bei akuten Ereignissen, die mit einer plötzlichen Steigerung des Sympathikotonus einhergehen, wie beispielsweise dem hämorrhagischen Schock [38], nach der Induktion einer Hypoglykämie und nach einer mechanischen Körperfixierung [39], sowie nach physischem Stress [40], konnten erhöhte Melatoninspiegel nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung schwer kranker Patienten zeigen sich dagegen verringerte Melatoninspiegel im Blut [41, 42, 43, 44].

Durch andere Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass die Zirbeldrüse nicht das einzige Organ ist, das Melatonin produziert. Vor allem in lymphozytenreichen Organen [45] wie dem Knochenmark [46], Thymus [47], Gastrointestinaltrakt [48], Haut [49] aber auch in Thrombozyten [50], Hoden [51] und in der Retina [52] konnte

Melatonin nachgewiesen werden. Melatonin wird dabei eine entscheidende Rolle bei der Informationsweiterleitung zugeschrieben [37, 53].

### **4.6.1 Protektive Eigenschaften von Melatonin**

Sewerynek und Kollegen waren die ersten, die zeigen konnten, dass die Gabe von Melatonin zu einer Reduktion einer LPS- induzierten oxidativen Schädigung [54], einer DNA Schädigung [55] *in vivo*, wie auch Lipidoxidation *in vitro* führen konnte [56]. Maestoni und Kollegen entdeckten, nach der Gabe von Melatonin, eine Verbesserung des Überlebens nach Induktion einer Endotoxämie durch die Injektion von LPS bei Mäusen [57]. In den folgenden Jahren konnten verschiedene Forschergruppen zeigen, dass die exogene Gabe des Zirbeldrüsenhormons zu einer Verbesserung des Überlebens [58, 59, 60] und zu einer verminderten Organdysfunktion [61, 62] der Sepsis führt. Dies konnte durch die Verminderung des oxidativen Stresses [35, 63], durch Wirkung als starke antiapoptotische Substanz [64] und durch Reduktion der Inflammation [65] in einer Vielzahl von Spezies nach einer polymikrobiellen Sepsis oder Endotoxämie gezeigt werden. Nicht nur bei der Behandlung der bakteriellen Sepsis oder LPS induzierter Endotoxämie zeigt sich dieses therapeutische Potential, sondern auch bei der Behandlung von viral [66], mykotisch [67] oder parasitär [68] verursachter Sepsis wirkt Melatonin protektiv.

### **4.6.2 Antioxidative Wirkung**

Zunächst ging man davon aus, dass die protektiven Eigenschaften von Melatonin seiner starken antioxidativen Wirkung [54, 64, 65] durch Elimination freier Radikale [69, 70] zuzuschreiben ist. Durch die Bildung von 3-Hydroxymelatonin scheint Melatonin in der Lage zu sein, Hydroxyl-Radikale zu neutralisieren [71]. Weiterhin wurde gezeigt, dass Melatonin mit toxischen Reagenzien wie Peroxyl-Radikalen [72], Singulett-Sauerstoff [73] und Wasserstoffperoxid [74] interagiert. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass Metaboliten von Melatonin auch selbstständig Radikale entgiften können, z.B. der Hauptmetabolit der Leber 6-Hydroxymelatonin, sowie N-acetyl-N-formyl-5-methoxykynuramine und N-acetyl-5-methoxykynuramine [74, 75,

76]. Dieses Schneeballprinzip der Radikalentfernung bekam den Namen "*the antioxidant cascade of Melatonin*" [36, 76].

### 4.6.3 Rezeptor vermittelte Wirkung

Aktuelle Untersuchungen deuten daraufhin, dass einige der protektiven Eigenschaften von Melatonin auch über die Aktivierung von Melatoninrezeptoren vermittelt werden [36, 77, 78, 79, 80]. Diese Melatoninrezeptoren sind hochaffine, membranständige, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit der offiziellen Kurzbezeichnung MT1 und MT2 (frühere Bezeichnung: Mel1a and Mel1b) [81]. Für einen dritten Melatoninrezeptor (MT3) wurde gezeigt, dass er ein Äquivalent der intrazellulären Quinon-Reduktase-2 (=NAD(P)H Dehydrogenase) ist [82]. Durch die Aktivierung der MT1 und MT2 Rezeptoren werden verschiedene Signalwege beeinflusst, u.a. cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat), Signalwege über die Inhibition der Adenylatzyklase, Proteinkinase A und der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB-1 (*cAMP response element-binding protein*). Ebenso ist ein Einfluss auf die Aktivität der Phospholipasen A2 und C und auf Kalzium und Kalium Kanäle beschrieben [53, 83, 84, 85, 86]. Über diese Rezeptoren werden vielfältige Funktionen im Organismus vermittelt, die längst noch nicht alle bekannt sind. Bereits bekannt sind Einflüsse auf den Gefäßtonus [87, 88] und die Regulation des Wärmehaushalts [89]. Auch eine Veränderung der Immunfunktion bei Säugetieren wurde, nach der Gabe von Melatonin, beobachtet [90]. Da Melatoninrezeptoren auf menschlichen Monozyten entdeckt wurden [91], könnte daraus geschlossen werden, dass eine Aktivierung von Melatoninrezeptoren mit einer entsprechenden Veränderung der Zytokinspiegel einhergeht und die Veränderung der Immunfunktion hierauf zurückzuführen ist. Außerdem scheint die Aktivierung unter anderem zu einer verstärkten Expression antioxidativer Enzyme [79, 80, 92, 93] und zu einer verminderten Expression prooxidativer Enzyme [94, 95, 96, 97] zu führen. Nach der Induktion eines hämorrhagischen Schocks und der ischämischen Reperfusion zeigte Melatonin eine verminderte Organdysfunktion durch rezeptorabhängige Effekte [78]. Weiterhin zeigte die Arbeit von Mathes und Kollegen, dass die Therapie und Vorbehandlung mit dem Melatoninrezeptor

Agonisten Ramelteon zu einer Verbesserung der Leberfunktion und Leberperfusion nach Induktion eines hämorrhagischen Schocks bei der Ratte führt [78].

### **4.6.3.1 Ramelteon**

Ramelteon ist ein selektiver Melatoninrezeptor Agonist, der ursprünglich zur Behandlung der Insomnie entwickelt wurde [98]. Ramelteon hat im Gegensatz zu Melatonin keine direkte antioxidative Wirkung, bindet aber mit einer hohen Affinität und Selektivität an die Melatoninrezeptoren MT1 und MT2 [99]. Diese Bindungsaffinität ist dabei sogar höher als die von Melatonin, an MT3 Rezeptoren jedoch geringer [99]. Ramelteon besitzt keine Affinität für Benzodiazepin-, Dopamin-, Opiat-Rezeptoren, Ionenkanäle und Transporter. Auch konnten für diesen Agonisten keine Effekte auf die Aktivität vieler Enzyme gefunden werden [99].

### **4.6.3.2 Luzindole**

In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich die organprotektive Wirkung von Melatonin teilweise durch die Substanz Luzindole aufheben lässt. Von Dubocovich und Kollegen wurde gezeigt, dass Luzindole ein Melatoninrezeptor Antagonist darstellt [100], der an MT1 und MT2 Rezeptoren bindet [101]. Die spezifische Bindung an MT2 Rezeptoren besitzt dabei eine höhere Affinität, als die von Melatonin [102]. Neben der Bindung von Melatoninrezeptoren konnten für Luzindole starke antioxidative Eigenschaften nachgewiesen werden [103]. Trotzdem konnte Luzindole die günstigen Eigenschaften von Melatonin antagonisieren. Dies konnte gezeigt werden nach experimenteller Myokardschädigung durch ischämische Reperfusion [104], sowie durch Cyclosporin A [105], nach Gehirnschädigung in einem neonatalen Modell [106], bei einer durch Stress bedingten Magenschädigung [107], sowie in der Leber nach hämorrhagischem Schock [78, 108]. Das protektive Potential scheint somit nicht alleine durch antioxidative Eigenschaften erklärbar zu sein, sondern vielmehr auch auf einer Aktivierung von Melatoninrezeptoren zu beruhen.



## **4.7 Fragestellung**

Das Potential eines selektiven Melatoninrezeptor Agonisten, mit seiner isolierten Wirkung über die Melatonin-spezifischen Rezeptoren, wurde als eine mögliche und sinnvolle Behandlungsoption bei der Sepsistherapie, im direkten Vergleich zur Reinsubstanz Melatonin, noch nicht untersucht. Daher war es Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob das pineale Hormon Melatonin und der selektive Melatoninrezeptor Agonist Ramelteon das Überleben, die Hämodynamik, den Säure-Basenhaushalt und die Immunfunktion nach polymikrobieller Sepsis bei der Ratte beeinflussen. Um Aussagen über die Reversibilität der durch die Aktivierung von Melatoninrezeptoren vermittelten Wirkung treffen zu können, wurde ebenfalls die Wirkung des Melatoninrezeptor Antagonisten Luzindole untersucht. Durch diese Arbeit sollen weitere Erkenntnisse geliefert werden, ob die Aktivierung von Melatoninrezeptoren ein potentiellles Therapiekonzept bei der Behandlung der Sepsis darstellen kann.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Versuchstiere

Alle Versuche wurden nach Genehmigung durch die zuständige Tierschutzkommission der Landesbehörde (Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz in Saarbrücken, Tierschutzantrag Nr. 16/2008) durchgeführt. Als Versuchstiere dienten männliche Sprague-Dawley Ratten mit 200 - 250 g Körpergewicht, was einem Alter von 8 - 10 Wochen entspricht. Die Versuchstiere wurden von Charles River (Fa. Wiga, Sulzfeld, Deutschland) bezogen und vor Versuchsbeginn an einen 12 h Tag-Nacht Rhythmus mit einer Lichtzeit von 5:00 Uhr bis 17:00 Uhr gewöhnt. Alle Versuche wurden zwischen den Zeitgeberzeiten 2 und 3 Stunden begonnen. Die Tiere befanden sich bis zum Tag des Versuches unter klimatisierten Bedingungen (Lufttemperatur:  $20^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$  und  $50 \pm 5 \%$  relative Luftfeuchtigkeit). 12h vor Operationsbeginn wurde den Tieren das Futter entzogen; freier Zugang zu Wasser stand jederzeit zur Verfügung. Es wurden nur gesunde Tiere in die Versuche mit eingeschlossen.

#### 5.1.2 Chemikalien

Die Reinsubstanzen der verwendeten Medikamente: Ramelteon (Takeda Pharmaceutical Company, Osaka, Japan), Luzindole (Bachem, Weil am Rhein, Germany) und Melatonin wurden in 0,1 % Dimethyl Sulfoxid (DMSO) gelöst. Bis zu einer Konzentration von 10 % ist DMSO unschädlich [109]. In den vorliegenden Versuchen wurde eine Endkonzentration von 5% DMSO nicht überschritten.

Zur Narkoseeinleitung und Aufrechterhaltung, sowie zur Tötung der Ratten nach Ablauf der Beobachtungszeit, wurde Pentobarbital-Natrium (Narcoren®, Merial GmbH, Hallbergmoos) verwendet.

Zur Stimulation der Zytokinantwort wurde ein Lipopolysaccharid (LPS) verwendet, dass von dem gramnegativen Bakterium *Escherichia coli* (Serogruppe 0111:B4) gewonnen wird. Mitov und Kollegen konnten zeigen, dass es bei der Gabe von 1 µg/ml LPS zu einer maximalen Zytokinstimulation in Blutkulturen des Menschen kommt [110]. Die Konzentration von 1 µg/ml des bakteriellen Toxins als optimalen Stimulus der Zytokinfreisetzung wird auch durch andere Studien bestätigt [111, 112]. Als Zellkulturmedium wurde RPMI-1640 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet. Es besteht aus einem Hydrogencarbonat-Puffersystem, angereicht durch verschiedene Nährstoffe wie Glukose, Salze, Aminosäuren und Vitamine. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien von Sigma-Aldrich (München, Deutschland) bezogen und waren von der höchsten erhältlichen Reinheit (*molecular grade*).

## 5.2 Methodik

### 5.2.1 Versuchsaufbau

Bei dem verwendeten Sepsis Modell handelt es sich um ein modifiziertes Modell der Zökum Ligatur und Inzision, erstmalig beschrieben durch Scheiermann und Kollegen [113], welches einer polymikrobiellen Sepsis im klinischen Alltag sehr nahe kommt (Einzelheiten siehe unten).

#### 5.2.1.1 Narkoseeinleitung

Zur Narkose Einleitung erfolgte eine intraperitoneale Injektion mit 50 mg/kg KG Pentobarbital.

Die Injektion erfolgte in den linken unteren Quadranten. Die Narkosetiefe wurde so angepasst, dass die Tiere bei erhaltener Spontanatmung keine Reaktion mehr auf Schmerzreize (Kneifen in die Schwanzwurzel) und auditorische Reize zeigten. Erst nach dem Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe, wurde mit der Operation begonnen.

### 5.2.1.2 Operative Vorbereitung

Die narkotisierten Tiere wurden zunächst gewogen, um eine körpergewichtsbezogene Volumensubstitution und Medikamentengabe zu gewährleisten. Danach wurden die Tiere auf einem Korkbrett mittels Pflaster (Hansa Leukoplast) an allen vier Extremitäten, am Schwanz und dem Kopf fixiert. Die Fixierung erfolgte in Rückenlage bei rekliniertem Kopf, um ein optimales Operationsfeld zu gewährleisten. Direkt zu Beginn wurde die Zunge vorsichtig aus dem seitlichen Mundwinkel herausgezogen, um ein Zurücksinken des Zungengrundes und dadurch eine Verlegung der Atemwege zu verhindern. Um eine Körpertemperatur von ca. 37 °C aufrecht erhalten zu können, wurden Wärmelampen installiert. Für die Tracheotomie wurde ein medianer Hautschnitt zwischen Mandibular und Manubrium sterni durchgeführt. Nun wurde die Trachea durch stumpfe Präparation unter der Mittellinie der infrahyalen Muskulatur freigelegt. Nach Anschlingen der Trachea mittels Bindfäden, erfolgte die Querinzision zwischen zwei Trachealknorpelspangen. In die dabei entstehende Öffnung wurde ca. 0,5 cm tief ein leicht angespitzter Plastiktubus von 4 cm Länge (PE-Schlauch, Portex Limited, Hythe, Kent, Großbritannien) eingeführt und fixiert. Die durchgeführte Tracheotomie diente der Sicherung der Atemwege bei erhaltener Spontanatmung des Tieres.

Nachdem eine suffiziente Atmung gesichert war, erfolgte das Anlegen eines Zentralvenösen-Katheters (ZVK) in die rechte Vena jugularis externa. Diese wurde durch stumpfe Präparation freigelegt und mit der Hilfe von zwei Bindfäden angeschlungen. Der kraniale Bindfaden diente der Ligatur des oberen Gefäßabschnitts, wodurch ein anterograder Blutfluss aus dem venösen Gefäß verhindert wurde. Mit der Hilfe von zwei kleinen Arterien-Klemmen, die an beiden Enden der Bindfäden angelegt wurden, wurde die Vena jugularis externa leicht vorgespannt, um die Arbeit am Gefäß zu erleichtern. Danach erfolgte eine Inzision mit Hilfe einer mikrochirurgischen Pinzette und Schere von ca. 1/3 des Gefäßdurchmessers und das Einführen des ZVK. Der ZVK bestand aus einem mit Ringerlösung vorgefüllten Polyethylen Katheter (PE) 50 (0,4 x 0,8 mm, Braun, Melsungen, Deutschland) und wurde ca. 1,5 cm kaudalwärts bis in die Höhe der Vena cava superior vorgeschoben. Der venöse Zugang wurde nun mit Hilfe der zwei Bindfäden fixiert und über einen Dreiwegehahn an einen Perfusor (Perfusor® segura

FT, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) angeschlossen. Zur Deckung des Flüssigkeitsbedarfs erfolgte die kontinuierliche Gabe von 10 ml/kg/h Ringeracetat-Lösung (eine sterile, isotone, pyrogen-freie Vollelektrolytlösung). Über den ZVK erfolgte auch die repetitive, intravenöse Gabe einer verdünnten Lösung des Pentobarbitals (10 mg/kg KG) zur Aufrechterhaltung der Narkose nach Bedarf, sowie die Gabe der im Versuch verwendeten Medikamente.

Zur Überwachung der Vitalparameter und zur Blutentnahme wurde zusätzlich ein arterieller Zugang in die linke Arteria carotis communis gelegt.

Hierfür wurde die Arteria carotis communis unter vorsichtiger, stumpfer Präparation aus der Gefäß-Nerven-Scheide dargestellt und mit Hilfe von Bindfäden angeschlossen. Mit dem kranialen Bindfaden wurde der obere Teil der Arteria carotis communis ligiert, um eine Blutung aus diesem Gefäß zu verhindern. Eine mikrochirurgische Gefäßklemme wurde nun möglichst weit kaudal zwischen dem kaudalen und medialen Bindfaden platziert. Die Arterie wurde leicht vorgespannt mit Hilfe des kranialen Bindfadens. Die Inzision erfolgte mittels mikrochirurgischer Pinzette und Schere auf ca. 1/3 des Gefäßlumens. Der leicht angespitzte, mit Ringerlösung vorgefüllte, Katheter (gleiches System wie bei ZVK Anlage) wurde nun bis zur Gefäßklemme vorgeschoben und mit Hilfe einer zweiten mikrochirurgischen Gefäßklemme fixiert. Der Katheter wurde mit dem medialen Bindfaden über der Carotis leicht fixiert, sodass ein Verschieben unter dem Knoten möglich war, ohne eine Blutung zu verursachen. Die beiden Gefäßklemmen über der Carotis wurden entfernt und der Katheter vorsichtig, ca. 1,5 cm, in Richtung Aortenbogen vorgeschoben. Die Fixation des Katheters erfolgte durch die Bindfäden mit chirurgischem Knoten. Über einen Dreiwegehahn wurde der arterielle Katheter an ein handelsübliches Druckwandler-System (PMSET 1DT-XX, Becton Dickinson) angeschlossen. Dadurch konnte eine kontinuierliche Überwachung des mittleren arteriellen Drucks (MAP) und der Herzfrequenz des Versuchstieres am Monitor (Hewlett Packard M1166A, Model 66S, Hewlett Packard GmbH, Böblingen, Deutschland) erfolgen.

Eine Entnahme der arteriellen Blutproben für die Blutgasanalysen und die Blutprobenentnahmen für die Zytokinuntersuchungen konnte ebenfalls über diesen

Zugang erfolgen. Die Wunde am Halsbereich wurde mit einem feuchten Tupfer bedeckt, um den Flüssigkeitsverlust zu reduzieren.

### **5.2.1.3 Induktion der Sepsis**

Die Induktion der polymikrobiellen Sepsis erfolgte nach einem modifizierten Modell der Coecum Ligatur und Inzision (CLI) nach Scheiermann und Kollegen [113]. Zunächst wurde durch eine mediale Inzision über dem Abdomen mittels einer Schere das Fell gespalten und die Bauchdecke auf einer Länge von ca. 2,5 cm freigelegt. Danach erfolgte eine mediale Laparotomie entlang der Linea alba. Das Coecum wurde aufgesucht und vorsichtig aus dem Bauchraum mobilisiert. Anschließend wurde das Coecum kurz vor der Ileocoecalklappe ligiert, ohne die Magen-Darm-Passage zu beeinträchtigen. Das Coecum wurde auf der antimesenterialen Seite auf einer Länge von 1,5 cm inzidiert. Alle Teile des Darms wurden anschließend ohne Auspressen des Darminhaltes wieder vorsichtig an orthograder Position in die Bauchhöhle zurückverlagert. Der Verschluss des Muskulus rektus abdominis erfolgte mittels Einzelknopfnähten. Das Fell wurde mittels fortlaufender Naht verschlossen. Bei Sham-operierten Tieren wurde wie oben beschrieben eine Laparotomie durchgeführt und das Coecum aus dem Bauchraum mobilisiert, jedoch nicht ligiert und nicht inzidiert. Anschließend wurde der Darm wieder in den Bauchraum zurückverlagert und die Bauchdecke verschlossen.

### **5.2.2 Versuchsprotokoll**

Alle in die Untersuchungen eingeschlossenen Tiere wurden auf 2 Versuchsabschnitte aufgeteilt und randomisiert den einzelnen Gruppen zugeordnet.

Versuchsprotokoll 1: Bestimmung der Überlebenszeit über 12 h

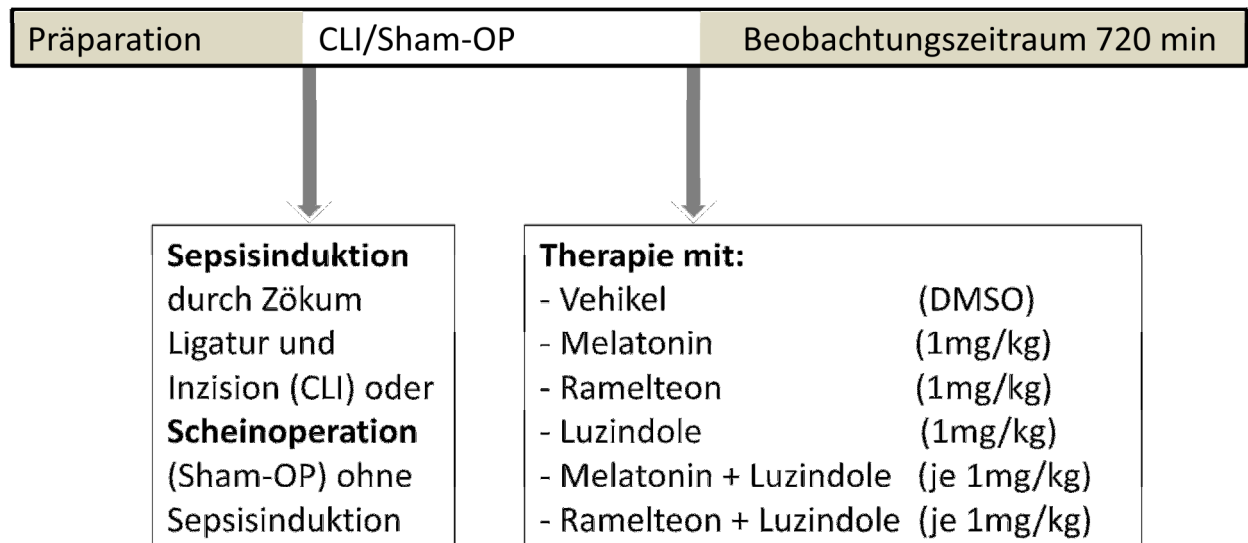
Versuchsprotokoll 2: Bestimmung der Immunfunktion

#### **5.2.2.1 Versuchsprotokoll zur Bestimmung der Überlebenszeit**

Für die Bestimmung der Überlebenszeit wurden die Tiere nach Sepsisinduktion entweder mit Kontrolllösung DMSO (Vehikel), Melatonin (Mel), Ramelteon (Rml), Luzindole (Lzn) oder Melatonin und Ramelteon jeweils in Kombination mit Luzindole

(Lzn+Mel; Lzn+Rml) behandelt (jeweils n=15 pro Gruppe) (siehe Abb.1). Die Tiere der Sham-Kontroll-Gruppe wurden nach der Scheinoperation nur mit Kontrolllösung DMSO (Vehikel) behandelt (n=5 für die Sham/Vehikel-Tiere). Gesamtzahl der Tiere: n = 95.

### Überlebenszeit:



**Abbildung 1: Versuchsprotokoll zur Bestimmung der Überlebenszeit**

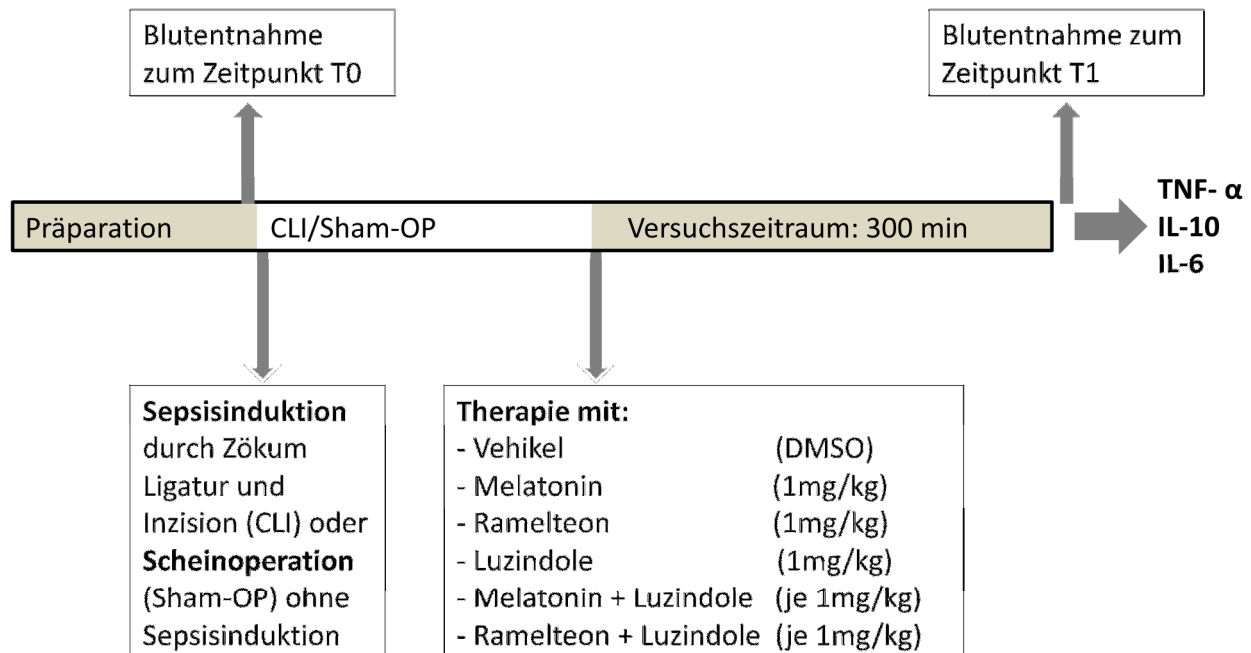
Unmittelbar nach der Sepsisinduktion (siehe Kapitel 5.2.1.3: Induktion der Sepsis) wurden die oben genannten Medikamente (jeweils 1 mg/kg KG i.v.) über den zuvor gelegten zentralvenösen Katheter (ZVK) als einmalige Gabe verabreicht. Der Melatoninrezeptor-Antagonist Luzindole wurde jeweils 10 min vor Melatonin oder Ramelteon appliziert. Als Vehikel-Lösung wurde 5% DMSO verwendet. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 12 Stunden überwacht. Während der Überwachung erfolgte eine regelmäßige Kontrolle der Atmung und der Narkosetiefe. Bei den Versuchstieren wurde alle 2 Stunden eine Blutgasanalyse durchgeführt (siehe 5.3). Nach Herzstillstand wurde der Sterbezeitpunkt dokumentiert und in die Letalitätsstatistik aufgenommen. Falls Versuchstiere den Beobachtungszeitraum von 12 Stunden überschritten, wurden sie mittels einer Überdosis Pentobarbital getötet.

### **5.2.2.2 Versuchsprotokoll zur Bestimmung der Immunfunktion**

Für die Bestimmung der Immunfunktion wurde den Tieren vor Sepsisinduktion oder Scheinoperation zum Zeitpunkt (T0) Blut über einen arteriellen Katheter entnommen und für die Analyse der stimulierten und unstimulierten TNF- $\alpha$ , IL-10 und IL-6 Konzentration weiterbehandelt (Weiterbehandlung der Blutproben siehe Kapitel 5.4 ff.). Im Anschluss an die Blutentnahme wurde entweder mit Kontrolllösung DMSO (Vehikel), Melatonin, Ramelteon, Luzindole oder Melatonin und Ramelteon jeweils in Kombination mit Luzindole (n=5 pro Gruppe, Gesamtzahl der Tiere= 60 Ratten) behandelt (siehe Abb.2). Alle Versuchstiere erhielten isovulämische Dosen (jeweils 1 mg/kg KG i.v.) dieser Medikamente über den zuvor gelegten ZVK als einmalige Gabe unmittelbar nach der Sepsisinduktion oder Schein-OP. Der Antagonist Luzindole wurde jeweils 10 min vor Melatonin oder Ramelteon gegeben. Die Vehikel-Tiere erhielten nur eine isovulämische Menge einer 5% DMSO Kontrolllösung i.v.. 5h nach Sepsisinduktion oder Scheinoperation, zum Zeitpunkt (T1), wurde den Tieren erneut Blut über den arteriellen Katheter entnommen und für die Analyse der stimulierten und unstimulierten TNF- $\alpha$ , IL-10 und IL-6 Konzentration weiterbehandelt (Weiterbehandlung der Blutproben siehe Kapitel 5.4 ff.). Nach der Entnahme der Blutprobe wurden die Tiere mit einer Überdosis Pentobarbital getötet.



**Immunfunktion:**



**Abbildung 2: Versuchprotokoll zur Bestimmung der Immunparameter**

### 5.3 Hämodynamik und Blutgasanalyse

Während des Versuchsablaufs erfolgte eine kontinuierliche Überwachung mit halbstündlicher Dokumentation des mittleren arteriellen Druckes und der Herzfrequenz. Das Blut für die Blutgasanalyse wurde bei den Tieren im 1. Versuchsabschnitt unmittelbar vor Sepsisinduktion zum Zeitpunkt T0 und anschließend alle 2 Stunden entnommen. Entnommen wurden jeweils 0,2 ml frisches arterielles Blut aus der A. carotis communis. Die letzte Blutentnahme erfolgte bei Ableben des Tieres (MAP < 25mmHg) oder unmittelbar nach Ablauf des Beobachtungszeitraums von 12 Stunden. Die Blutgasanalyse erfolgte an einem kombinierten automatischen Blutgas-Analysator Standardgerät (STAT profile 5, Nova Biochemicals, Rödermark, Deutschland). Aus den Blutproben wurden der Hämoglobin Wert (Hb in g/dl), der pH-Wert, der Basenüberschuss (Base Excess, BE in [mmol/l]) und der Laktatwert (mmol/l) ermittelt.

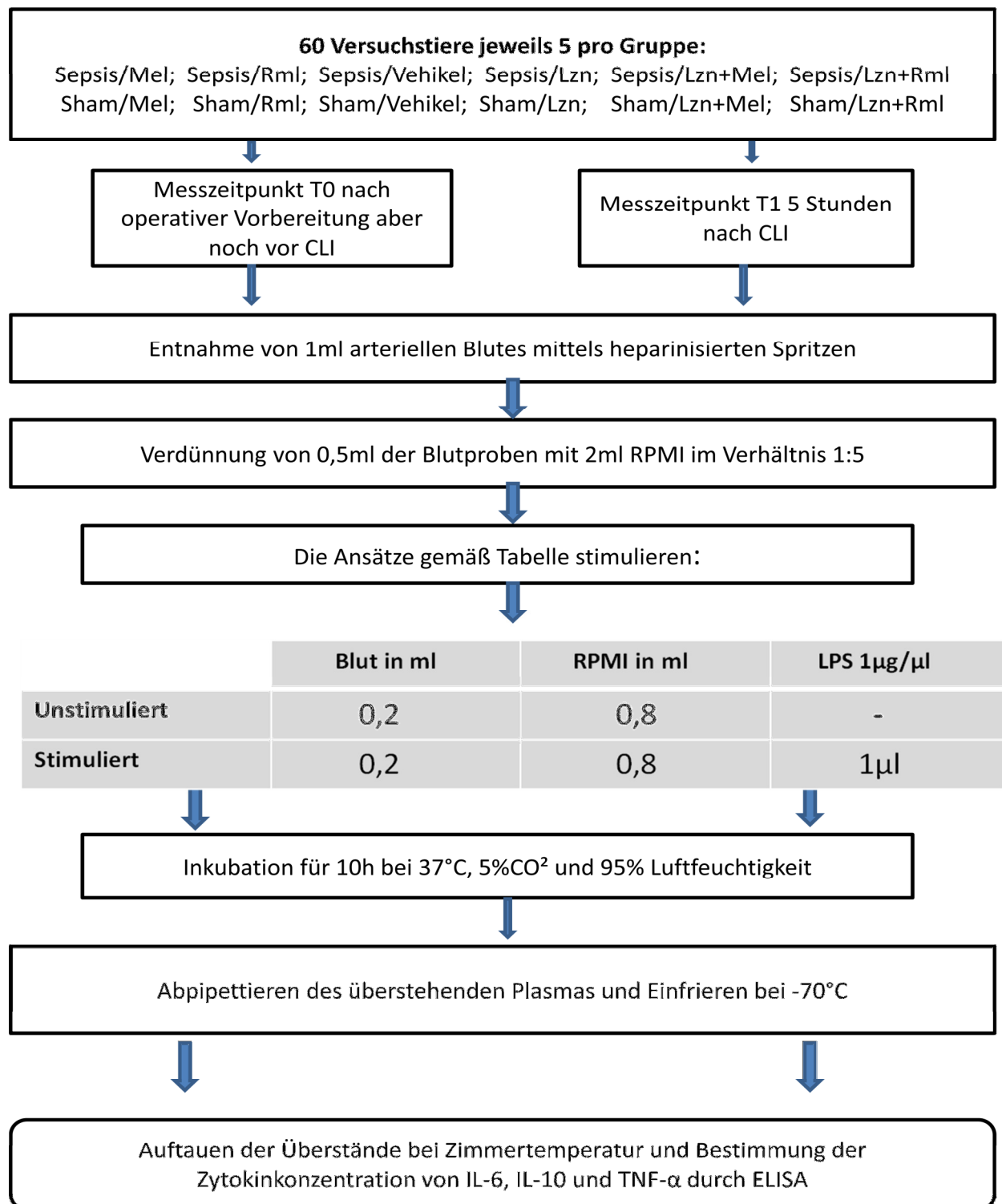
## **5.4 Untersuchungen zur Zytokinantwort**

### **5.4.1 Probenentnahme**

Je 1,0 ml arterielles Blut, der Tiere des 2. Versuchsabschnittes wurde zu den Zeitpunkten T0 und T1 mit einer heparinisierten Spritze abgenommen. Direkt nach der Blutentnahme wurden die Proben nach einem erstmals durch Wilson und Kollegen [114] beschriebenen Modell mit Modifikationen nach Kleinschmidt [115] aufbereitet, um sie der Zytokinbestimmung zugänglich zu machen.

### **5.4.2 Vollblutansätze**

0,5 ml der entnommenen Blutprobe wurde in sterile Gefäße (Falcon; Becton Dickinson, Lincoln Park, NY) gegeben und mit 2 ml RPMI im Verhältnis 1:5 verdünnt und gevortext. Anschließend wurden je 1 ml des Gemisches in 2 Wells einer sterilen, pyrogen-freien 48-Well-Zellkulturplatte (Cellstar®, Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Österreich) pipettiert. Eine der beiden Proben wurde mit 1 µg/ml LPS stimuliert. Die Wells wurden bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit für 10 Stunden inkubiert. Die Überstände eines jeden Ansatzes wurden mittels Pipette auf 2 Eppendorfgefäße verteilt und bis zur Messung der Zytokinkonzentration durch Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) bei -70 °C eingefroren (siehe Abb.3).

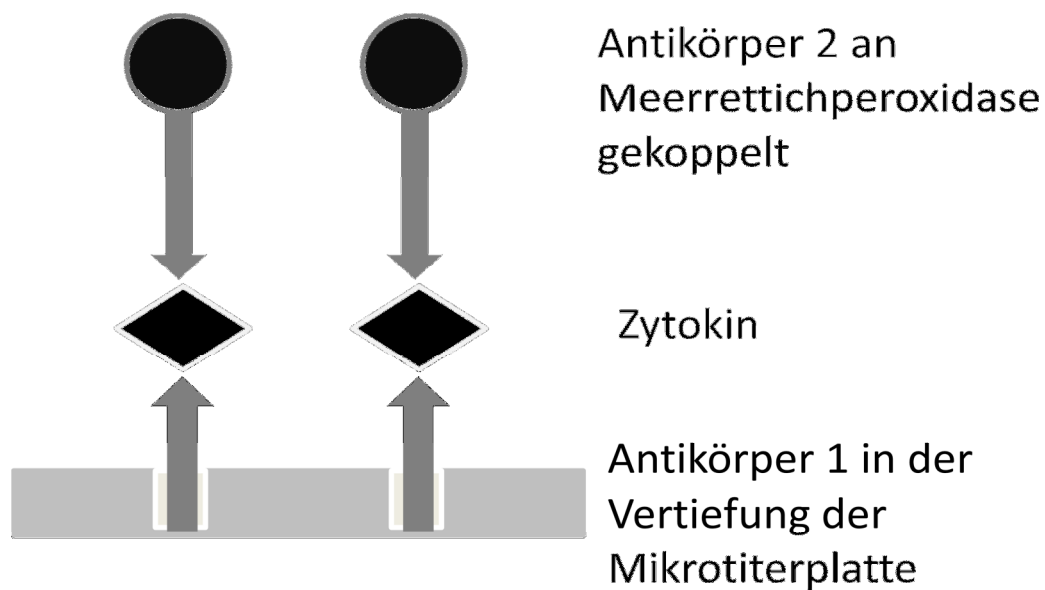


**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Zytokinbestimmung**

Lzn = Luzindole, Mel = Melatonin, Rml = Ramelteon, RPMI = Zellkulturmedium, LPS = Lipopolysaccharid, ml = Milliliter, ELISA = Enzyme linked immunabsorbent assay, CLI = Zökum Ligatur und Inzision

### 5.4.3 ELISA-Messung der Zytokinkonzentration

Zur Zytokinmessung wurde ein ELISA (Enzyme linked immunabsorbent assay von Roche Molecular Diagnostics Mannheim, Germany) verwendet. Die eingefrorenen Plasma Überstände wurden der Messung innerhalb der nächsten sechs Monate nach Probenentnahme zugeführt. Für die Bestimmung der Zytokinkonzentration von TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-10 wurden die Proben bei Zimmertemperatur aufgetaut. Für die Messung wurden Zytokinassays benötigt, dabei handelt es sich um kommerziell erhältliche ELISA-Kits (BD OptiEIA™; BD Biosciences Pharmingen), die alle nach dem Sandwichprinzip (siehe Abbildung 4) arbeiten. Dabei wird das zu messende Zytokin zwischen zwei spezifischen Antikörpern fixiert. Die Antikörper binden hierbei an verschiedenen Epitopen des Zytokins. Der erste Antikörper (auch coating Antikörper genannt) wird auf dem Boden der Mikrotiterplatte fixiert. Die Probe, in der sich das zu messende Zytokin befindet, wird hinzugegeben und die Inkubationszeit abgewartet. Während dieser Zeit wird das zu messende Zytokin vor Ort durch den coating Antikörper auf dem Boden der Mikrotiterplatte gebunden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Platte gewaschen und alle ungebundenen Partikel aus der Probe entfernt. Übrig bleibt das gesuchte Zytokin fixiert am Boden der Mikrotiterplatte durch den coating Antikörper. Im nächsten Schritt wird ein zweiter Antikörper (auch detection Antikörper genannt) hinzugegeben, der an eine andere Oberflächenstruktur des Zytokins bindet und mit dem Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt ist. Durch einen erneuten Waschvorgang werden alle nichtgebundenen Antikörper entfernt. Durch Zugabe einer peroxidaseabhängigen Substratlösung kommt es zu einem Farbumschlag, der proportional der Menge des spezifisch gebundenen Zytokins ist.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des ELISA Sandwich-Prinzips**

Das zu messende Zytokin (schwarz) wird zwischen den beiden Antikörpern fixiert. Durch die an Antikörper 2 gebundene Peroxidase (schwarz, mit grauem Rand) kann mittels Zugabe einer peroxidaseabhängigen Substratlösung ein Farbumschlag sichtbar gemacht werden der proportional der Menge des zu messenden Zytokins ist.

Bei Raumtemperatur wurde eine Inkubationszeit von 30 Minuten abgewartet. Die Enzymreaktion wurde danach in Dunkelheit mittels Zugabe einer einmolaren Schwefelsäurelösung ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) gestoppt und der Farbumschlag mittels eines ELISA-Readers photometrisch gemessen und durch die zugehörige Software ausgewertet. Zur Quantifizierung wurde bei jedem neuen Assay eine standard Kurve (Bezugskurve) ermittelt, indem in den ersten beiden Spalten der Mikrotiterplatte bekannte Konzentrationen des zu bestimmenden Zytokins aufgebracht wurden.

Um im linearen Bereich der Bezugskurven zu bleiben, war für einige Proben eine vorherige Verdünnung mit Waschpuffer nötig. Die Verdünnung wurde bei den darauffolgenden Berechnungen der Zytokinkonzentration entsprechend berücksichtigt. Nach Herstellerangaben lag die minimale messbare Konzentration, geschätzt anhand der durchschnittlichen optischen Dichte, abgelesen von 0 Standards plus 2 Standardabweichungen bei 2,6 pg/ml für  $\text{TNF-}\alpha$ , bei 1,0 pg/ml für

IL-10 und bei 1,8pg/ml für IL-6. Die berechneten Interassay und Interassay Koeffizienten der Abweichung waren 4,2% und 3,7% für TNF- $\alpha$ , 5,9% und 4,8% für IL-6 und 5,4% und 3,9% für IL-10.

### 5.5 Statistische Analyse

Die statistische Planung und Auswertung wurde unter Verwendung von BiAS für Windows 9.02 (Epsilon, Frankfurt, Germany) durchgeführt. Die Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung der Überlebenszeit basierten auf Daten, die von Wu veröffentlicht wurden [61]. Die Studie zeigt eine Überlebensrate von 73,3% für Vehikel Tiere und eine Verbesserung der Überlebensrate auf 100,0% für Melatonin behandelte Tiere, 9 Stunden nach Sepsisinduktion durch CLP (Zökum Ligatur und Punktion) bei der Ratte. Die Anzahl der Versuchstiere lag bei  $n=15$  mit einer Power von 0,8 und  $\alpha=0,05$ . Die Probengröße zur Bestimmung der Immunfunktion basierte auf den Daten von Interleukin1- $\beta$  in der gleichen Publikation. Angenommen ein minimal messbarer Unterschied mit durchschnittlich 0,50 und einer erwarteten Standardabweichung von 0,15 liegen vor; so ergibt sich daraus eine Probengröße von  $n=4$  mit einer Power von 0,80 und  $\alpha=0,05$ .

Alle Daten wurden auf Normalverteilung mittels des Kolomogorov-Smirnov Testes überprüft. Bei normalverteilten Daten wurde die Analyse mittels des one-way analyses of variance (ANOVA) durchgeführt, gefolgt von einer post-hoc Testung gemäß der Student-Newman-Keuls Methode.

Nicht normalverteilte Daten wurde mittels Kruskal-Wallis ANOVA analysiert, gefolgt von einer post-hoc Testung nach der Dunns Methode. Gegebensfalls wurden wiederholte Berechnungen von One Way ANOVA oder ANOVA on Ranks verwendet.

Die erhobenen Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) für parametrische Werte oder Mittelwerte  $\pm$  25<sup>th</sup>/75<sup>th</sup> Perzentilen für nicht-parametrische Werte angegeben.

Die Überlebensrate wird in Prozent angegeben und mittels dem two-tailed Fishers exakt Test analysiert. Die mittlere Überlebenszeit wurde mit einem log-rank Modell nach Kaplan Meier analysiert und durch einen paarweisen Vergleich unter Gebrauch

der Holm-Sidak Methode überprüft. Sie wird ausgedrückt als der Mittelwert  $\pm$  SD und 95% Konfidenz-Intervall (CI). Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als signifikant angesehen.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Überlebenszeit

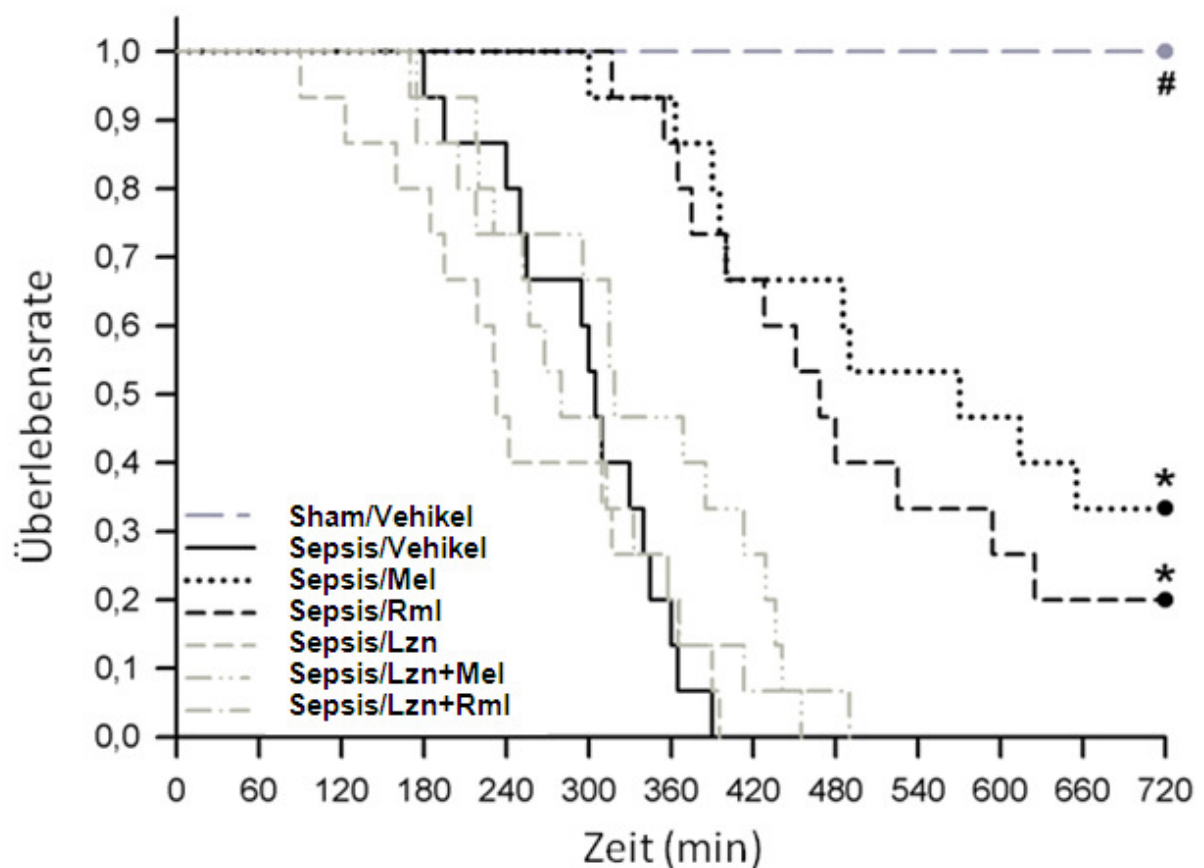
Alle Sham Tiere überlebten den Beobachtungszeitraum von 12 Stunden (Sham/Vehikel 5 von 5; 100%). Nach Sepsisinduktion zeigte sich eine Verlängerung der mittleren Überlebenszeit bei den mit Ramelteon (Rml) und Melatonin (Mel) behandelten Tieren im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Dieser Unterschied war statistisch signifikant:  $p < 0,001$  für Sepsis/Rml mit (Sepsis/Rml:  $502,9 \text{ min} \pm 36,7 \text{ SD}$ ; 95% CI  $430,9 - 574,8 \text{ min}$ ; Median: 468 min) und Sepsis/Mel (Sepsis/Mel:  $550,8 \text{ min} \pm 40 \text{ SD}$ ; 95% CI  $470,8 - 630,8 \text{ min}$ ; Median: 570) im Vergleich zu unbehandelten Tieren (Sepsis/Vehikel:  $297,0 \text{ min} \pm 16 \text{ SD}$ ; 95% CI  $265 - 328 \text{ min}$  Median 305 min) (siehe Abbildung 5).

Die Überlebenszeit der Melatonin behandelten Tiere unterschied sich nicht signifikant von der Gruppe der Ramelteon behandelten Tiere ( $p = 0,352$ ). Die Verlängerung der Überlebenszeit, die sich bei den mit Melatonin und Ramelteon behandelten Tieren zeigte, wurde durch die zusätzliche Gabe von Luzindole (Lzn) vollständig aufgehoben (Sepsis/Lzn+Rml:  $293 \text{ min} \pm 23 \text{ SD}$ ; 95% CI  $248-338 \text{ min}$  Median: 280 min; und Sepsis/Lzn+Mel:  $334 \text{ min} \pm 24 \text{ SD}$ ; 95% CI  $287-381 \text{ min}$ ; Median 319 min). Dies war statistisch signifikant ( $p < 0,001$  für Sepsis/Rml vs. Sepsis/Lzn+Rml und für Sepsis/Mel vs. Sepsis/Lzn+Mel). Es gab keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf das Überleben zwischen Sepsis-Tieren, die mit Vehikel, Luzindole, Melatonin + Luzindole oder Ramelteon + Luzindole behandelt wurden. 12 h nach Sepsisinduktion lebten in der Melatonin-Gruppe 5 von 15 Tieren (33,33%). In der Ramelteon-Gruppe noch 3 von 15 Tieren (20,0%). In der Vehikel-Gruppe überlebte dagegen kein Tier den 12 h Beobachtungszeitraum (0%). Diese Verbesserung der Überlebensrate war signifikant für die Therapie mit Melatonin (Fishers exakt Test:  $p = 0,04$  vs. Sepsis/Vehikel), jedoch nicht für die Therapie mit Ramelteon (Fishers exakt Test:  $p = 0,22$  vs. Sepsis/Vehikel). Durch die Zugabe von Luzindole wurde die verbesserte Überlebensrate aufgehoben



## Ergebnisse

(Sepsis/Lzn+Mel: keine von 15; 0%;  $p = 0,04$  vs. Sepsis/Mel; und Sepsis/Lzn+Rml: keine von 15; 0%;  $p = 0,22$  vs. Sepsis/Rml).



**Abbildung 5: Überlebenszeit**

Aufgetragen ist die Überlebensrate gegen die Zeit in einem log-rank Modell nach Kaplan Meier. Der Beobachtungszeitraum endete nach 720 min (12h).

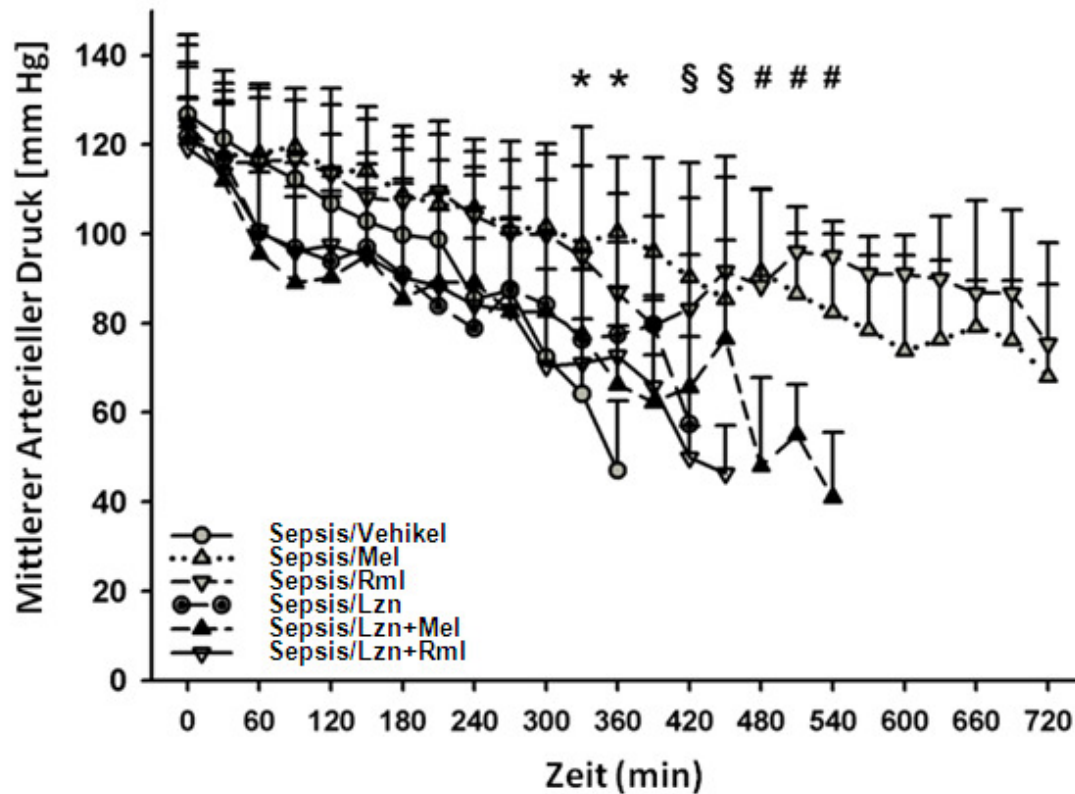
Ein Stern (\*) steht für  $p < 0,001$  vs. Sepsis/Vehikel, Sepsis/Lzn, Sepsis/Lzn+Mel und Sepsis/Lzn+Rml; eine Raute (#) steht für  $p < 0,001$  vs. alle andern Gruppen ( $n = 5$  für die Sham/Vehikel Gruppe,  $n = 15$  für alle anderen Gruppen). Min = Minuten. Lzn = Luzindole, Mel = Melatonin, Rml = Ramelteon, Sepsis = Sepsisinduktion durch Zökum Ligatur und Inzision (CLI), Sham = Scheinoperation ohne Sepsisinduktion.

## 6.2 Hämodynamische Werte

Die Ausgangswerte für den mittleren arteriellen Druck (MAP) unterschieden sich nicht zwischen den einzelnen Gruppen ( $p=0,48$ ) und blieben bei den Sham-Tieren über den gesamten Verlauf des Versuchs hinweg konstant (nicht dargestellt in der Abbildung). Bei allen Sepsis Tieren zeigte sich im Verlauf des Beobachtungszeitraums ein allmählichen Abfall des MAP.

Die hämodynamische Dekompensation schritt bei den Vehikel- und Luzindole-Gruppen am schnellsten voran. Im Vergleich dazu erfolgte der Abfall des MAP in den Melatonin- und Ramelteon-Gruppen deutlich langsamer. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied nach 330 min für Sepsis/Mel ( $n=14$  mit  $p=0,022$ ) und für Sepsis/Rml ( $n=14$  mit  $p=0,015$ ), verglichen mit Sepsis/Vehikel ( $n=5$ ). Noch deutlicher zeigte sich der signifikante Unterschied nach 360 min für Sepsis/Mel ( $n=14$  mit  $p=0,003$ ) und für Sepsis/Rml ( $n=12$  mit  $p=0,012$ ), verglichen mit Sepsis/Vehikel Tieren ( $n=2$ ).

Die zusätzliche Gabe von Luzindole zu Melatonin und Ramelteon führte zu einem kompletten Verschwinden dieser hämodynamischen Stabilität mit  $p<0,05$  für Sepsis/Lzn+Rml nach 420 und 450 min und  $p<0,05$  für Sepsis/Lzn+Mel nach 480-540 min. Zwischen den Sepsis-Gruppen, die mit Vehikel, Luzindole, Ramelteon+Luzindole oder Melatonin+Luzindole behandelt wurden, konnte zu keiner Zeit ein signifikanter Unterschied gefunden werden ( $p>0,05$ ) (siehe Abb. 6).



**Abbildung 6: Mittlerer Arterieller Blutdruck (MAP)**

Dargestellt ist der MAP der Tiere nach Sepsisinduktion im zeitlichen Verlauf der Versuche zur Bestimmung der Überlebenszeit. Ein Stern (\*) steht für  $p < 0.05$  für Sepsis/Vehikel vs. Sepsis/Rml und Sepsis/Mel, ein Paragraphen Zeichen (§) steht für  $p < 0.05$  für Sepsis/Rml vs. Sepsis/Lzn+Rml, und eine Raute (#) steht für  $p < 0.05$  für Sepsis/Mel vs. Sepsis/Lzn+Mel. Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $n=15$  pro Gruppe zu Beginn des Experiments) wiedergegeben. Min = Minuten, mmHg = Millimeter Quecksilbersäule. Lzn = Luzindole, Mel = Melatonin, Rml = Ramelteon.

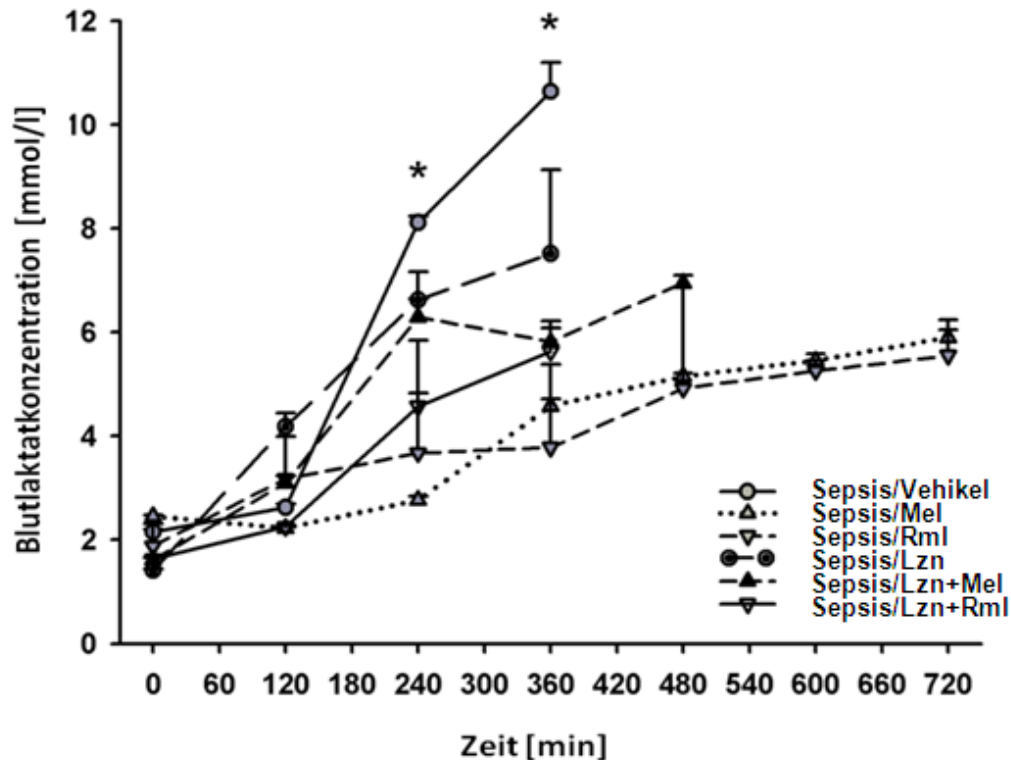
### **6.3 Blutgasanalyse BGA**

Bei den Sham-operierten Tieren zeigten sich alle Parameter der Blutgasanalyse im Verlauf des Versuchs stabil (nicht gezeigt in den Abbildungen). Nachfolgend werden die Ergebnisse für den Laktat Wert, den pH-Wert und den Base-Exzess aufgeführt.

#### **6.3.1 Laktat Werte**

Bei allen Versuchsgruppen zeigte sich kein Unterschied zwischen den Laktat-Spiegeln zu Beginn des Experiments ( $p=0,63$ ). Im Verlauf kam es zu einem signifikanten Anstieg der Laktatwerte in allen Sepsis-Gruppen ( $p<0,05$  vs. Baseline ab 240 min für Sepsis/Vehikel, Sepsis/Lzn und Sepsis/Lzn+Mel, ab 360 min für Sepsis/Lzn+Rml, sowie ab 480 min für Sepsis/Rml und ab 600 min für Sepsis/Mel) (Abb. 7). Dabei zeigte sich, dass die Blutlaktatwerte der Sepsis-Gruppen, die mit Vehikel oder mit Luzindole behandelt wurden, deutlich schneller anstiegen als die, die ausschließlich mit Ramelteon oder Melatonin behandelt wurden; dies war signifikant nach 240 min ( $p<0,001$  für Sepsis/Mel [ $n = 15$ ] und für Sepsis/Rml [ $n = 15$ ] vs. Sepsis/Vehikel [ $n=12$ ]) und ab 360 min ( $p<0,001$  für Sepsis/Mel [ $n=14$ ] und für Sepsis/Rml [ $n=13$ ] vs. Sepsis/Vehikel [ $n=2$ ]).

Die zusätzliche Gabe von Luzindole hob diesen Effekt auf ( $p<0,05$  vs. die betreffende Vergleichsgruppe für Sepsis/Lzn+Rml ab 360 min und für Sepsis/Lzn+Mel ab 240 und 360 min). Es zeigte sich zu keiner Zeit ein signifikanter Unterschied zwischen der Sepsis/Mel und Sepsis/Rml Gruppe ( $p>0,05$ ).



**Abbildung 7: Laktatkonzentration im Blut:**

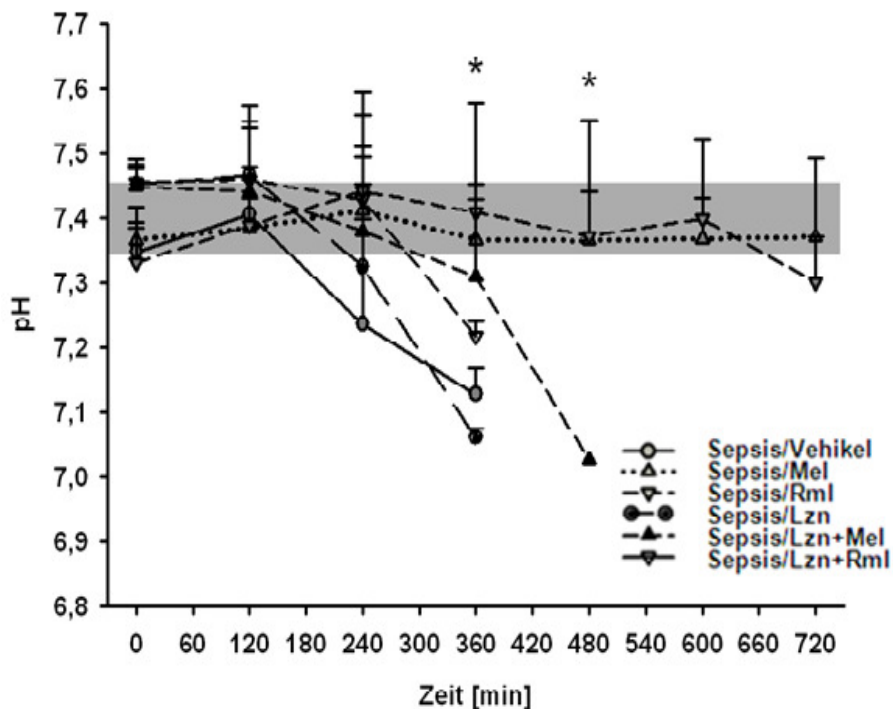
Dargestellt ist die Blutlaktatkonzentration der Tiere mit Sepsis im zeitlichen Verlauf der Versuche zur Bestimmung der Überlebenszeit. Ein Stern (\*) steht für  $p < 0,05$  für Sepsis/Vehikel vs. Sepsis/Rml und Sepsis/Mel. Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $n=15$  pro Gruppe am Anfang des Experiments) angegeben. l = Liter, Lzn = Luzindole, Mel = Melatonin, min = Minuten, mmol = Millimol, Rml = Ramelteon.

### 6.3.2 pH-Wert und Base Exzess

In den Ausgangswerten der Blutgasanalysen gab es keine Hinweise auf einen Unterschied bezüglich des pH-Wertes (Abb. 8) und des Base Exzesses (BE) (Abb. 9) zwischen den einzelnen Gruppen (für pH:  $p = 0,186$ ; für BE:  $p = 0,795$ ). Beide Parameter fielen in der Vehikel-Gruppe schneller, als in den Therapiegruppen mit Ramelteon und Melatonin. Der Unterschied zeigte sich als signifikant nach 360 min verglichen mit Sepsis/Rml und Sepsis/Mel und nach 480 min verglichen mit

## Ergebnisse

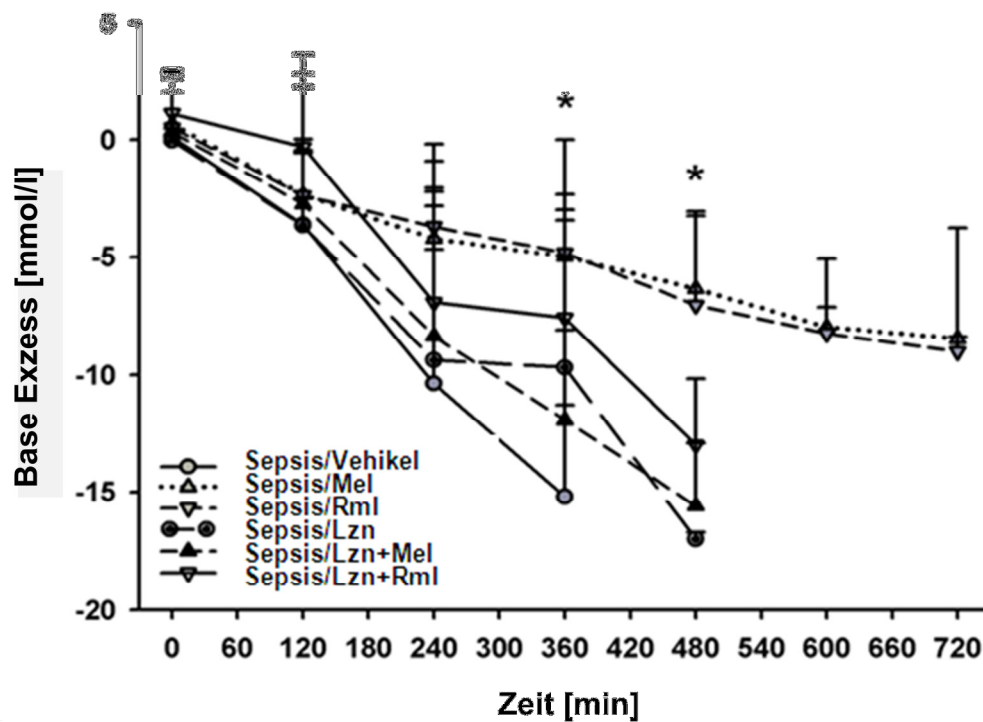
Sepsis/Lzn für pH und Base Excess jeweils mit  $p < 0,05$ . Die zusätzliche Gabe von Luzindole hob diesen durch Melatonin und Ramelteon verursachten Effekt komplett auf ( $p < 0,05$  vs. betreffende Vergleichsgruppe nach 360 und 480 min). Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Sepsis/Mel und Sepsis/Rml während des gesamten Experimentes ( $p > 0,05$ ).



**Abbildung 8 pH-Wert:**

Aufgetragen sind der pH-Wert der Tiere unter Sepsis im zeitlichen Verlauf der Versuche zur Bestimmung der Überlebenszeit.

Der graue Balken gibt den physiologischen pH-Bereich im Blut wieder. Ein Stern (\*) steht für  $p < 0,05$  für Sepsis/Rml and Sepsis/Mel vs. Sepsis/Vehikel (360 min) und vs. Sepsis/Lzn (480 min). Die Daten werden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $n=15$  pro Gruppe zu Beginn des Experiments) angegeben. Lzn = Luzindole, min = Minuten, Lzn = Luzindole, Mel = Melatonin, pH = negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration, Rml = Ramelteon.



**Abbildung 9: Base Exzess:**

Aufgetragen sind der Base Excess unter Sepsis im zeitlichen Verlauf der Versuche zur Bestimmung der Überlebenszeit.

Ein Stern (\*) steht für  $p < 0,05$  für Sepsis/Rml und Sepsis/Mel vs. Sepsis/Vehikel (360 min) und vs. Sepsis/Lzn (480 min). Die Daten werden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $n=15$  pro Gruppe zu Beginn des Experiments) angegeben. l = Liter, Lzn = Luzindole, min = Minuten, mmol = Millimol. Lzn = Luzindole, Mel = Melatonin, Rml = Ramelteon.

### 6.3.3 Hämoglobin Werte

Um intraabdominelle Blutungen als einen potentiellen Störfaktor ausschließen zu können, wurden die Hämoglobinwerte aller Tiere am Anfang und am Ende der Experimente bestimmt.

In keiner Gruppe gab es einen signifikanten Unterschied zwischen den Ausgangswerten und den Werten am Ende der Versuche (jeweils  $p > 0,05$ ) (Tabelle. 2). Weiterhin gab es keine Unterschiede der Ausgangswerte ( $p = 0,131$ ) und der Werte am Ende des Versuchs ( $p = 0,21$ ) zwischen den einzelnen Gruppen.

	Ausgangswerte	Experiment Ende
Sham/Vehikel	$11,2 \pm 1,4$ g/dl	$11,0 \pm 2,8$ g/dl
Sham/Rml	$10,7 \pm 1,3$ g/dl	$12,0 \pm 1,2$ g/dl
Sham/Mel	$10,8 \pm 0,8$ g/dl	$12,2 \pm 0,5$ g/dl
Sham/Lzn	$11,0 \pm 1,1$ g/dl	$11,6 \pm 2,4$ g/dl
Sepsis/Vehikel	$10,4 \pm 2,3$ g/dl	$11,0 \pm 2,8$ g/dl
Sepsis/Rml	$11,7 \pm 1,3$ g/dl	$10,9 \pm 0,9$ g/dl
Sepsis/Mel	$10,8 \pm 0,8$ g/dl	$12,2 \pm 0,5$ g/dl
Sepsis/Lzn+Rml	$10,7 \pm 1,2$ g/dl	$11,6 \pm 0,9$ g/dl
Sepsis/Lzn+Mel	$10,2 \pm 1,3$ g/dl	$11,6 \pm 0,6$ g/dl

**Tabelle 1: Hämoglobin Werte:**

Beinhaltet alle Versuchsgruppen der Versuchsabschnitte 1 und 2. Dargestellt sind die Hämoglobinwerte am Anfang und am Ende des Versuches einer jeden Gruppe. Die angegebenen Werte werden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Lzn = Luzindole, Mel = Melatonin, Rml = Ramelteon, Sepsis = Sepsisinduktion durch Zökum Ligatur und Inzision, Sham = Scheinoperation ohne Sepsisinduktion.



## 6.4 Zytokinbestimmung

### 6.4.1 Die unstimulierte Zytokinantwort

Die Auswertung der unstimulierten TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-10 Konzentrationen zum Zeitpunkt T0 (unmittelbar vor Sepsisinduktion) zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen (TNF- $\alpha$ :  $p = 0,473$ ; IL-6:  $p = 0,400$ ; IL-10:  $p = 0,513$ ).

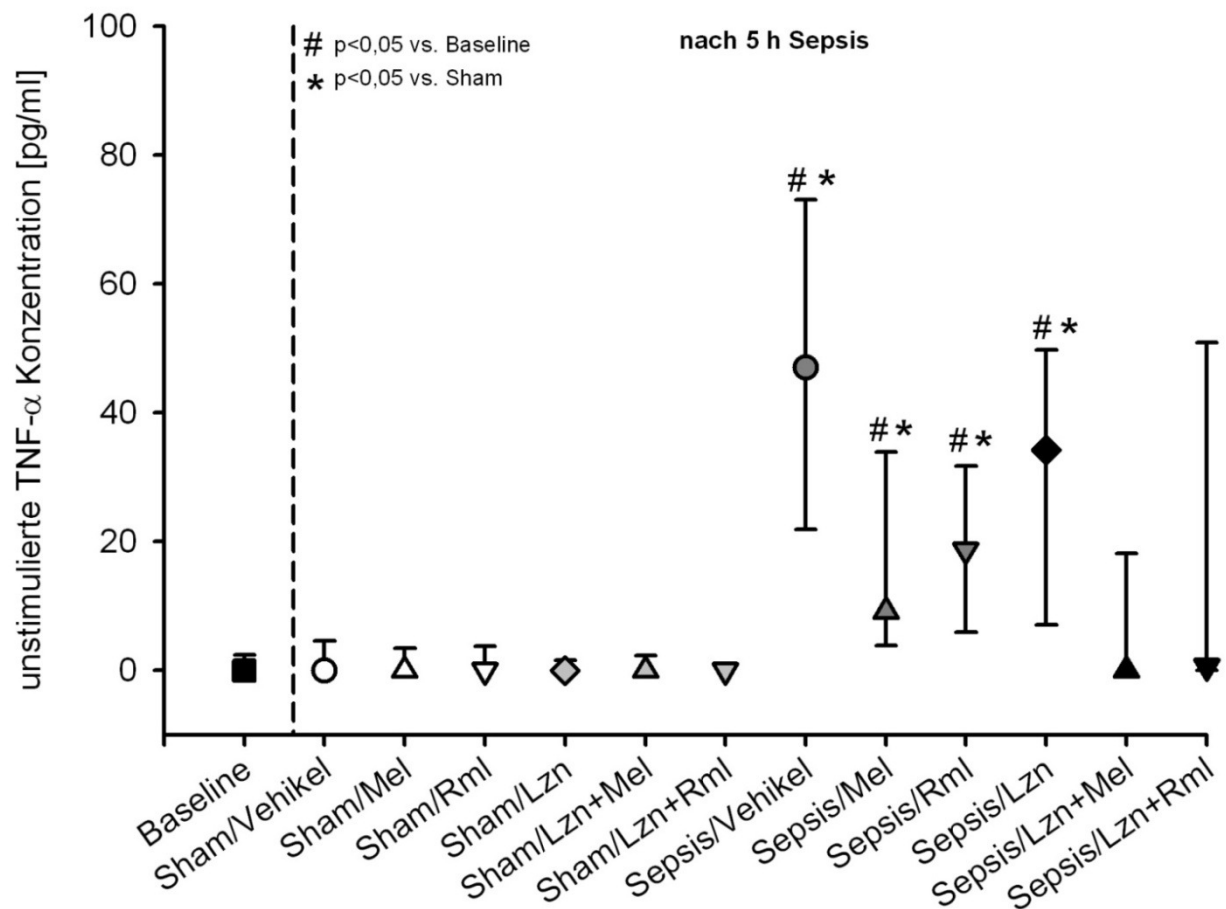
Alle Ausgangswerte der einzelnen Gruppen zum Zeitpunkt T0 sind aus Übersichtsgründen als kumulativer Datensatz (Baseline) in den Abbildungen 10, 11 und 12 dargestellt. Die statistische Analyse hingegen wurde mit den individuellen Daten einer jeden Gruppe durchgeführt.

Zusätzlich zeigte sich bei den Sham-Kontroll-Gruppen unabhängig von den verabreichten Medikamenten kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Zytokinspiegeln (TNF- $\alpha$ :  $p = 0,872$ ; IL-6:  $p = 0,490$ ; IL-10:  $0,279$ ) zum Zeitpunkt T1 (5h nach Sepsisinduktion).

#### 6.4.1.1 Unstimulierte TNF- $\alpha$ Konzentration

Bei den Sepsis-Tieren wurden zum Zeitpunkt T1 für fast alle Gruppen erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentrationen (Abb.10) gemessen. Im Vergleich zu den Ausgangswerten oder den Werten der zugehörigen Sham-Kontroll-Gruppe, waren diese TNF- $\alpha$  Plasmakonzentration signifikant erhöht (jeweils  $p < 0,05$ ). Nach der Gabe von Luzindole zu Melatonin oder Ramelteon war der Anstieg der unstimulierten TNF- $\alpha$  Plasmakonzentrationen (Abb.10) nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

Bei den mit Melatonin oder Ramelteon behandelten Tieren konnte ein erkennbarer Trend zu einer niedrigeren unstimulierten TNF- $\alpha$  Konzentration zum Zeitpunkt T1, im Vergleich zur Vehikel-Gruppe, festgestellt werden. Dies war jedoch nicht statistisch signifikant (Sepsis/Rml vs. Sepsis/Vehikel:  $p = 0,094$ ; Sepsis/Mel vs. Sepsis/Vehikel:  $p = 0,058$ ). Sham operierte Tiere zeigten unabhängig von der zugeführten Substanz keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Ausgangswerten und den Zytokinspiegeln nach 5 h Sepsis ( $p > 0,05$ ).



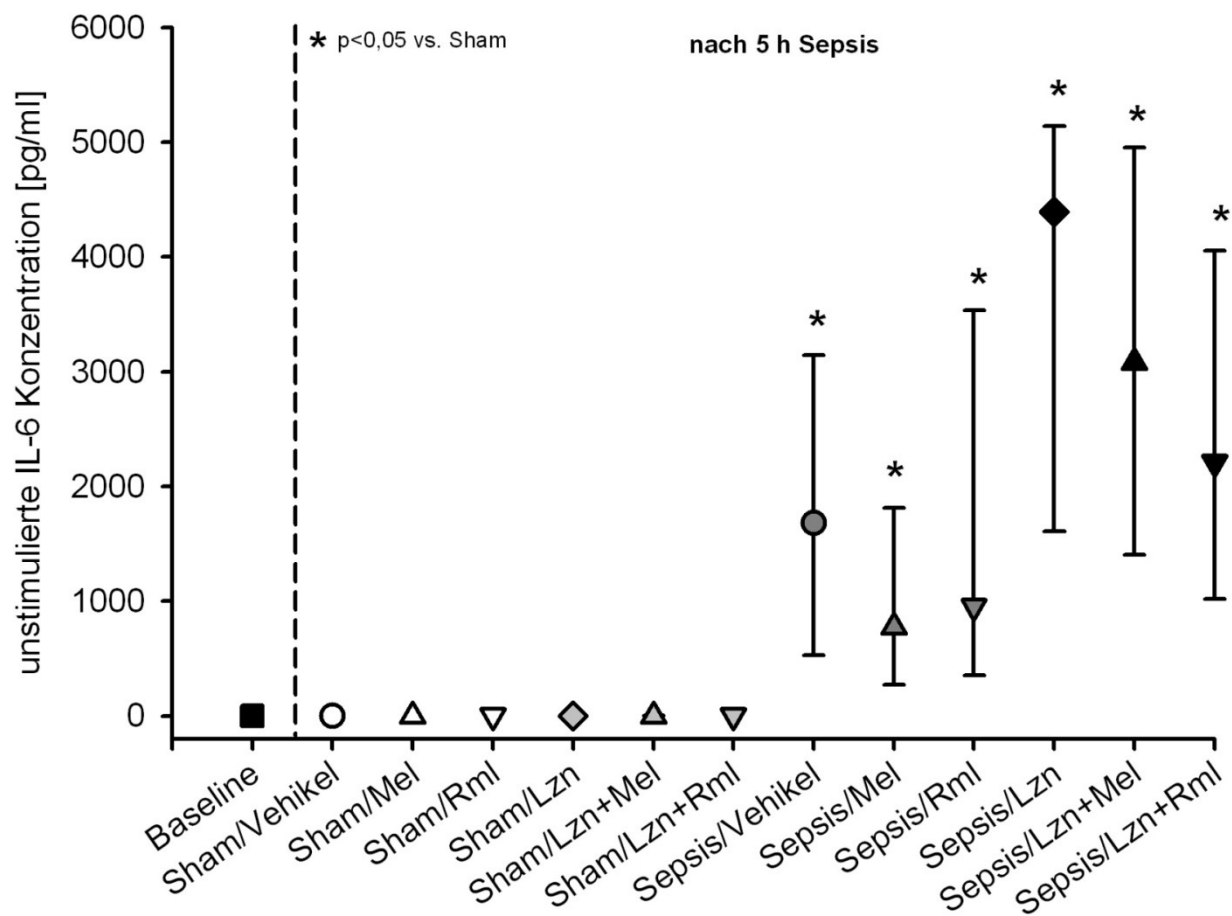
**Abbildung 10: Unstimulierte TNF- $\alpha$  Konzentration:**

Dargestellt ist die unstimulierte TNF- $\alpha$  Konzentration zum Zeitpunkt T0 (unmittelbar vor Sepsisinduktion, wiedergegeben als Baseline aus den Mittelwerten aller Gruppen) und zum Zeitpunkt T1 (5h nach Sepsisinduktion bzw. Scheinoperation). Sepsis = Sepsisinduktion durch Zökum Ligatur und Inzision, Sham = Scheinoperation ohne Sepsisinduktion.

Die Daten wurden als Median  $\pm$  25th/75th Perzentile (n=5 pro Gruppe) wiedergegeben. Ein p<0,05 = signifikant. Lzn = Luzindole, Mel = Melatonin, Rml = Ramelteon, ml = Milliliter, pg = Pikogramm.

### **6.4.1.2 Unstimulierte IL-6 Konzentration**

Bei den Sepsis-Tieren wurden zum Zeitpunkt T1 für alle Gruppen erhöhte IL-6-Konzentrationen gemessen ( $p < 0,05$ ) (Abb.11). Zum Zeitpunkt T1 zeigten sich zwischen den einzelnen Sepsisgruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ). Für die Sham-Tiere konnten unabhängig von der zugeführten Substanz keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Ausgangswerten und den Zytokinspiegeln zum Zeitpunkt T1 gefunden werden ( $p > 0,05$ ).

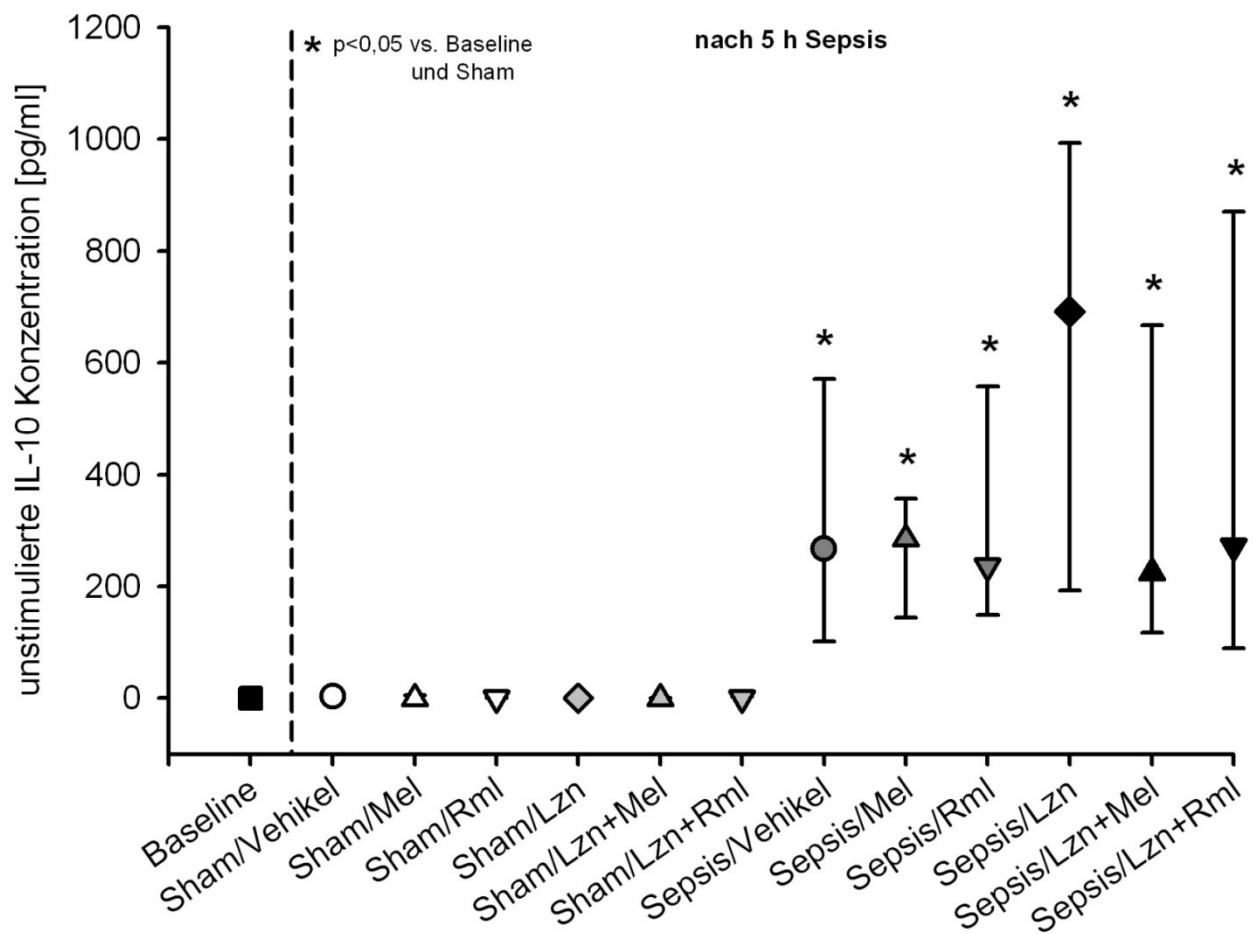


**Abbildung 11: Unstimulierte IL-6 Konzentration:**

Dargestellt ist die unstimulierte IL-6 Konzentration zum Zeitpunkt T0 (unmittelbar vor Sepsisinduktion, wiedergegeben als Baseline aus den Mittelwerten aller Gruppen) und zum Zeitpunkt T1 (5h nach Sepsisinduktion bzw. Scheinoperation). Sepsis = Sepsisinduktion durch Zökum Ligatur und Inzision, Sham = Scheinoperation ohne Sepsisinduktion. Die Daten wurden als Median  $\pm$  25th/75th Perzentile (n=5 pro Gruppe) wiedergegeben. Ein p<0,05 = signifikant. Lzn = Luzindole, Mel = Melatonin, Rml = Ramelteon, ml = Milliliter, pg = Pikogramm.

### **6.4.1.3 Unstimulierte IL-10 Konzentration**

Bei den Sepsis-Tieren wurden zum Zeitpunkt T1 für alle Gruppen erhöhte IL-10-Konzentrationen gemessen ( $p < 0,05$ ) (Abb.12). Zum Zeitpunkt T1 gab es zwischen den Sepsisgruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ). Für die Sham-Tiere konnten unabhängig der zugeführten Substanz keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Ausgangswerten und den Zytokinspiegeln zum Zeitpunkt T1 gefunden werden ( $p > 0,05$ ).



**Abbildung 12: Unstimulierte IL-10 Konzentration:**

Dargestellt ist die unstimulierte IL-10 Konzentration zum Zeitpunkt T0 (unmittelbar vor Sepsisinduktion, wiedergegeben als Baseline aus den Mittelwerten aller Gruppen) und zum Zeitpunkt T1 (5h nach Sepsisinduktion bzw. Scheinoperation). Sepsis = Sepsisinduktion durch Zökum Ligatur und Inzision, Sham = Scheinoperation ohne Sepsisinduktion. Die Daten wurden als Median  $\pm$  25th/75th Perzentile ( $n=5$  pro Gruppe) wiedergegeben. Ein  $p < 0,05$  = signifikant. Lzn = Luzindole, Mel = Melatonin, Rml = Ramelteon, ml = Milliliter, pg = Pikogramm.

### 6.4.2 Die stimulierte Zytokinantwort

Die Ausgangswerte für die mit LPS stimulierten TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-10 Plasmakonzentrationen unterschieden sich nicht zwischen den einzelnen Gruppen (TNF- $\alpha$ :  $p = 0,155$ ; IL-6:  $p = 0,077$ , IL-10:  $p = 0,119$ ).

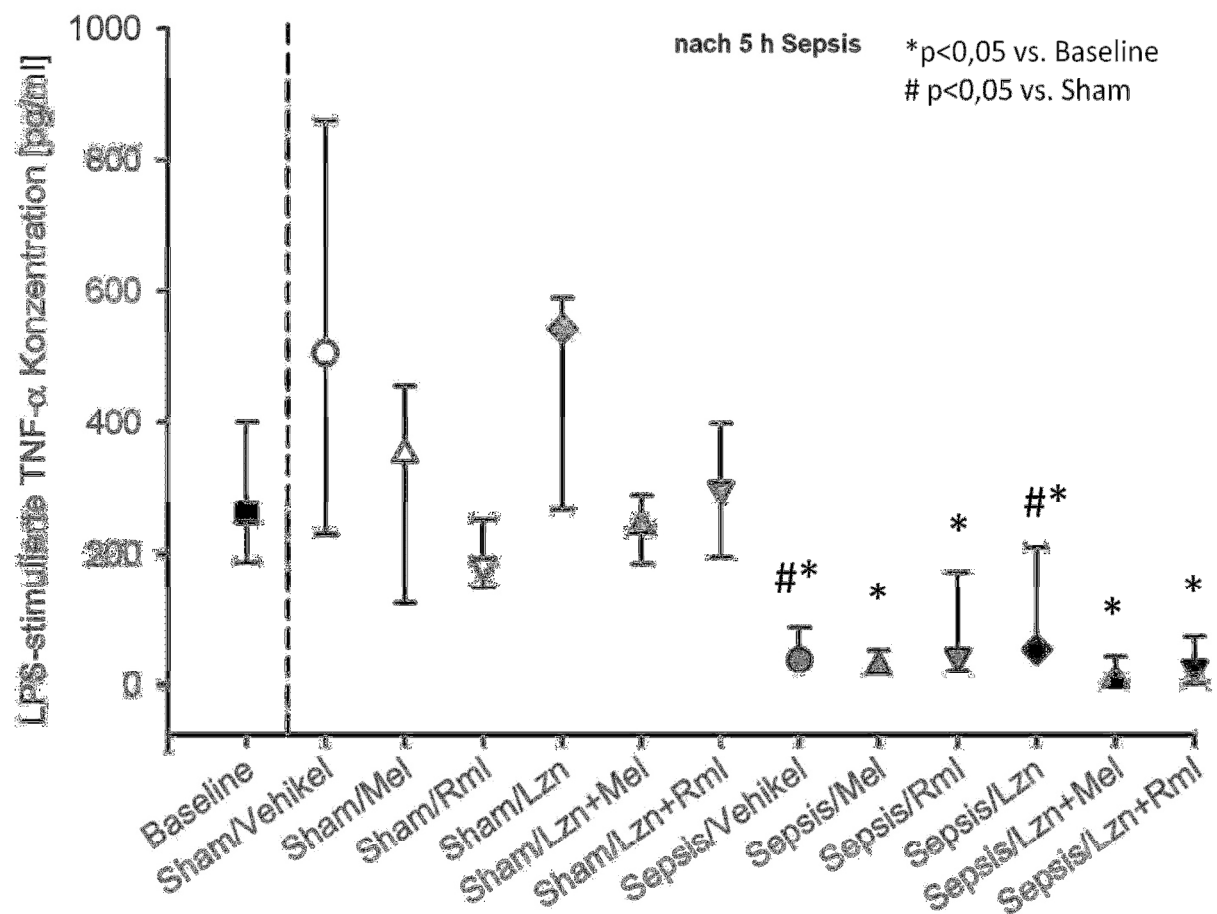
Alle Ausgangswerte der einzelnen Gruppen zum Zeitpunkt T0 sind aus Übersichtsgründen als kumulativer Datensatz (Baseline) in den Abbildungen 13, 14 und 15 dargestellt. Die statistische Analyse hingegen wurde mit den individuellen Daten einer jeden Gruppe durchgeführt.

Bei den Sham-Gruppen wurde zum Zeitpunkt T1, unabhängig von den verabreichten Substanzen, kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Zytokinkonzentrationen von TNF- $\alpha$ , IL-6 oder IL-10 gemessen (jeweils  $p > 0,05$ ).

#### 6.4.2.1 Stimulierte TNF- $\alpha$ Konzentration

In den Sham-Gruppen wurden zu keinem Untersuchungszeitpunkt unterschiedliche TNF- $\alpha$  (Abb. 13) Konzentrationen gemessen ( $p > 0,05$ ).

Bei allen Sepsis-Tieren war die stimulierte TNF- $\alpha$  Antwort zum Zeitpunkt T1 signifikant unterdrückt, verglichen mit den Baseline-Werten (jeweils  $p < 0,05$ ). Nach 5 h Sepsis zeigte sich bei den Sepsis-Tieren, die mit Vehikel oder Luzindole behandelt wurden, eine supprimierte TNF- $\alpha$  Freisetzung im Vergleich zu den korrespondierenden Sham-Gruppen (jeweils  $p < 0,05$ ). Die stimulierten TNF- $\alpha$  Spiegel unterschieden sich 5 h nach Sepsisinduktion nicht signifikant zwischen den einzelnen Sepsis-Gruppen ( $p = 0,183$ ).



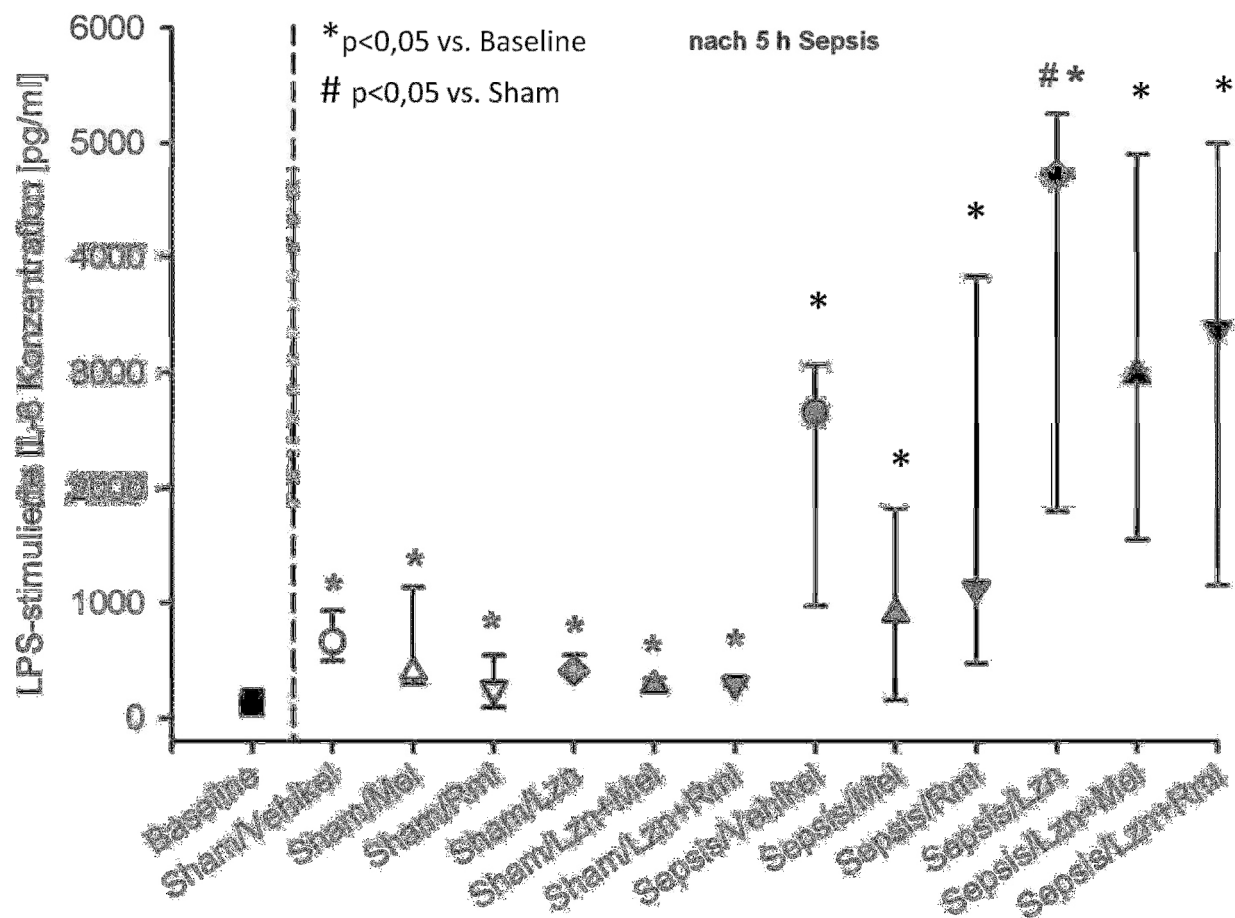
**Abbildung 13: Stimulierte TNF-α Konzentration:**

Dargestellt ist die stimulierte TNF-α Konzentration zum Zeitpunkt T0 (unmittelbar vor Sepsisinduktion, wiedergegeben als Baseline aus den Mittelwerten aller Gruppen) und zum Zeitpunkt T1 (5h nach Sepsisinduktion bzw. Scheinoperation). Sepsis = Sepsisinduktion durch Zökum Ligatur und Inzision, Sham = Scheinoperation ohne Sepsisinduktion. Die Daten wurden als Median ± 25th/75th Perzentile (n=5 pro Gruppe) wiedergegeben. Ein p<0,05 = signifikant. Lzn = Luzindole, Mel = Melatonin, Rml = Ramelteon, ml = Milliliter, pg = Pikogramm.



### 6.4.2.2 Stimulierte IL-6 Konzentration

Bei der Bestimmung der IL-6 Spiegel (Abb. 14) zeigten alle Sham-Tiere eine signifikant erhöhte IL-6 Konzentration zum Zeitpunkt T1, verglichen mit den Ausgangswerten zum Zeitpunkt T0 ( $p < 0,05$ ). 5h nach Sepsisinduktion war die stimulierte IL-6 Antwort signifikant erhöht, verglichen mit den Ausgangswerten (jeweils  $p < 0,05$ ). Bei CLI-Tieren war ein Trend zu einer erhöhten IL-6 Konzentration nach der zusätzlichen Gabe von Luzindole, verglichen mit der dazugehörigen Sham-Kontrollgruppe, erkennbar. Eine statistische Signifikanz zeigte sich für die Tiere, die nur mit Luzindole ( $p = 0,002$  vs. Sham/Lzn) behandelt wurden. Die stimulierten IL-6 Konzentrationen zum Zeitpunkt T1 unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Sepsis-Gruppen ( $p = 0,069$ ).

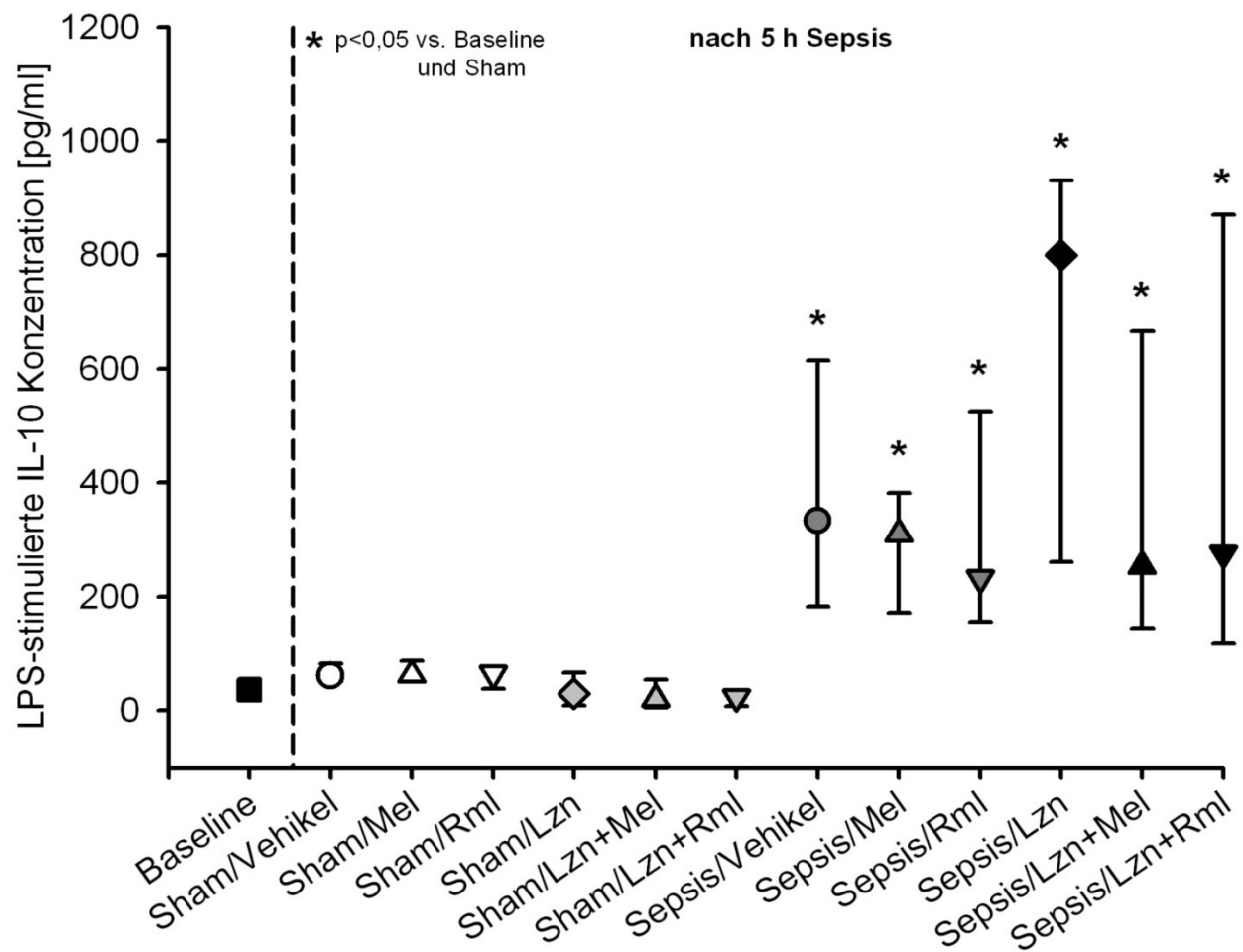


**Abbildung 14: Die Stimulierte IL-6 Konzentration:**

Dargestellt ist die stimulierte IL-6 Konzentration zum Zeitpunkt T0 (unmittelbar vor Sepsisinduktion, wiedergegeben als Baseline aus den Mittelwerten aller Gruppen) und zum Zeitpunkt T1 (5h nach Sepsisinduktion bzw. Scheinoperation). Sepsis = Sepsisinduktion durch Zökum Ligatur und Inzision, Sham = Scheinoperation ohne Sepsisinduktion. Die Daten wurden als Median  $\pm$  25th/75th Perzentile (n=5 pro Gruppe) wiedergegeben. Ein  $p < 0,05$  = signifikant. Lzn = Luzindole, Mel = Melatonin, Rml = Ramelteon, ml = Milliliter, pg = Pikogramm.

### **6.4.2.3 Stimulierte IL-10 Konzentration**

In den Sham-Gruppen wurden keine Unterschiede bei der IL-10 (Abb. 15) Konzentration zum Zeitpunkt T0 und T1 gemessen ( $p > 0,05$ ). Die Sepsis-Tiere zeigten signifikant erhöhte Konzentrationen für IL-10 zum Zeitpunkt T1, verglichen mit den Ausgangswerten und den Werten der Sham-Kontroll-Gruppen (jeweils  $p < 0,05$ ). Die IL-10 Spiegel unterschieden sich nicht signifikant zwischen den jeweiligen Sepsis Gruppen zum Zeitpunkt T1 ( $p = 0,873$ ).



**Abbildung 15: Die stimulierte IL-10 Konzentration:**

Dargestellt ist die stimulierte IL-10 Konzentration zum Zeitpunkt T0 (unmittelbar vor Sepsisinduktion, wiedergegeben als Baseline aus den Mittelwerten aller Gruppen) und zum Zeitpunkt T1 (5h nach Sepsisinduktion bzw. Scheinoperation). Sepsis = Sepsisinduktion durch Zökum Ligatur und Inzision, Sham = Scheinoperation ohne Sepsisinduktion. Die Daten wurden als Median  $\pm$  25th/75th Perzentile (n=5 pro Gruppe) wiedergegeben. Ein p<0,05 = signifikant. Lzn = Luzindole, Mel = Melatonin, Rml = Ramelteon, ml = Milliliter, pg = Pikogramm.

## 7 Diskussion

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel zu untersuchen, welchen Einfluss eine Melatoninrezeptoraktivierung mit dem pinealen Hormon Melatonin oder dem Melatoninrezeptor Agonisten Ramelteon auf das Überleben nach polymikrobieller Sepsis bei der Ratte hat und ob die dabei beobachteten Effekte durch eine Blockade der Melatoninrezeptoren mit dem Antagonisten Luzindole aufgehoben werden können.

Da nach aktueller Datenlage die Modulation der Immunantwort durch Melatonin ein möglicher Erklärungsansatz für seine organprotektiven Eigenschaften darstellen könnte, wurde zusätzlich in Vollblutansätzen die spontane und die durch LPS-Endotoxin stimulierte Freisetzung von TNF-alpha, IL-6 und IL-10 gemessen.

### 7.1 Diskussion der Ergebnisse

#### 7.1.1 Verbesserung der Überlebenszeit

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die exogene Applikation des pinealen Hormons Melatonin und des Melatoninrezeptor Agonisten Ramelteon zu einer verlängerten Überlebenszeit, nach polymikrobieller Sepsis, bei der Ratte führt. Dieser positive Effekt auf das Überleben konnte durch die gleichzeitige Gabe des Melatoninrezeptor Antagonisten Luzindole vollständig aufgehoben werden. Die vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass die protektiven Eigenschaften von Melatonin und Ramelteon durch eine Melatoninrezeptor Aktivierung erklärt werden können. Dabei scheint eine Modulation der Immunantwort keine wesentliche Rolle zu spielen. Bezüglich des Melatonins stimmen unsere Ergebnisse mit denen anderer Publikationen überein. Schon in vorausgegangenen Untersuchungen konnte in verschiedenen Tiermodellen eine Verlängerung des Überlebens nach exogener Gabe von Melatonin gezeigt werden. So konnten drei Forschergruppen unabhängig voneinander zeigen, dass es nach der Gabe von 5-20 mg/kg Melatonin nach LPS

induzierter Endotoxämie bei Mäusen und Ratten zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit kam [57, 59, 65]. Auch Wu und Kollegen konnten an Wistar Ratten zeigen, dass die wiederholte Gabe von 3 mg/kg des pineal Hormons 3, 6 und 12 Stunden nach polymikrobieller Sepsis, ausgelöst durch Coecum Ligatur und Punktion, zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit führte [61]. Dabei zeigte sich nach 9 Stunden eine Überlebensrate von 73% für unbehandelte Tiere, gegenüber einer Überlebensrate von 100% bei den mit Melatonin behandelten Tieren. Nach 18 Stunden lag die Überlebensrate unbehandelter Tiere bei 35,6% und die der mit Melatonin behandelten Tiere bei 80% [61]. In dem hier gezeigten CLI Model lag die Überlebensrate unbehandelter Sepsis-Tiere nach 12 Stunden bei 0%, bei den mit Melatonin behandelten Ratten bei 33% und bei den mit Ramelteon behandelten Tieren bei 20%. Das CLI-Modell, wie es in unserer Studie verwendet wurde, repräsentiert dabei ein fulminantes, polymikrobielles Modell einer 4 Quadranten Peritonitis die innerhalb kürzester Zeit untherapiert zum Tode führt.

### 7.1.1.1 Rezeptortheorie

Wenn Luzindole nach Sepsisinduktion zusätzlich zu Melatonin oder Ramelteon gegeben wurde, zeigte sich, dass die Verlängerung der Überlebensrate und -zeit vollständig aufgehoben wurde. Auch bei der alleinigen Gabe von Luzindole zeigte sich keine Verlängerung der Überlebenszeit, obwohl Luzindole starke antioxidative Eigenschaften aufweist [103]. Für Luzindole wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass es an den Melatonin-Rezeptor-Subtypen (MT1, MT2) antagonistisch binden kann [101, 116]. Bisher gibt es nur wenige Daten über die genaue Interaktion zwischen Melatoninrezeptoren, Melatonin und Luzindole [117], sowie über die dosisabhängige Wirkungsweise einer Luzindole-Gabe [118]. Jedoch deuten die Ergebnisse daraufhin, dass Melatonin, in dem von uns verwendeten Modell, das Überleben nicht in Form eines Antioxidanten und Radikalfängers verbessert, sondern die protektiven Effekte auf das Überleben rezeptorvermittelt induziert sind. Durch andere Arbeitsgruppen wurden bereits ähnliche Ergebnisse für den Melatoninrezeptor abhängigen positiven Effekt veröffentlicht. Zum Beispiel war Luzindole in der Lage die protektiven Eigenschaften von Melatonin bezüglich der Leber- [108, 119], Myokard- [104, 105], Nervenzell- [120], Hirn- [106] und

Magenschädigung [107] zu antagonisieren. Demgegenüber steht eine Arbeit von Lahiri und Kollegen, bei der die protektive Wirkung einer Vorbehandlung mit Melatonin bei Refluxösophagitis nicht durch Luzindole antagonisierbar war [121]. Mathes und Kollegen konnten nach hämorrhagischem Schock bei der Ratte zeigen, dass Luzindole zwar eine durch Melatonin erhaltene Leberfunktion aufheben kann, jedoch keine antagonistische Wirkung auf eine verbesserte hepatische Perfusion oder eine Reduktion des hepatischen Zellschadens aufweist [108]. Auch in einem in vitro Modell von Montilla und Kollegen konnte der protektive Effekt von Melatonin bei oxidativem Stress durch Oadainsäure auf Zellen nicht durch Luzindole antagonisiert werden. Dieser protektive Effekt scheint somit nicht Rezeptor vermittelt zu sein [122]. Hierbei könnten die starken antioxidativen Wirkungen von Melatonin [54, 64, 65] und Luzindole [103] in einem in vitro Modell die unterschiedlichen Ergebnisse erklären.

Die Hypothese, dass Melatonin seine protektiven Eigenschaften über Melatoninrezeptoren vermittelt, wird durch unsere Ergebnisse der Ramelteon Therapie unterstützt. Hier konnten wir zeigen, dass eine Verbesserung der Überlebenszeit, ähnlich der Melatonin-Therapie, erreichbar war. Für Ramelteon wurde schon früher gezeigt, dass es selbst keine relevanten direkten antioxidativen Eigenschaften aufweist [78]. Über die Aktivierung von Melatoninrezeptoren und damit verbundenen Steigerung der Genexpression antioxidativer Enzyme [79, 80], könnte Ramelteon indirekte antioxidative Eigenschaften aufweisen. Während dieser Versuche konnten wir keinen signifikanten Unterschied zwischen den mit Melatonin oder Ramelteon behandelten Tieren finden. Somit scheinen die direkten antioxidativen Eigenschaften von Melatonin nicht entscheidend für das verlängerte Überleben nach polymikrobieller Sepsis in der Ratte zu sein. Um die physiologische Bedeutung von Melatoninrezeptoren in der Sepsis besser verstehen zu können, wären weiterführende Untersuchungen an Melatoninrezeptor defizienten Tieren ein geeigneter Studienansatz.

### 7.1.2 Hämodynamik

Die hämodynamischen Ausgangswerte zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen und lagen in einem Bereich von ca. 120-140 mmHg. Im Verlauf des Beobachtungszeitraums zeigte sich bei allen Sepsis-Tieren ein allmählicher Abfall des MAP, wie dies schon von Scheiermann und Kollegen beschrieben wurde [113]. Die ausschließlich mit Melatonin und Ramelteon behandelten Sepsis-Tiere zeigten eine signifikant langsamere hämodynamische Dekompensation im Vergleich zu den anderwertig behandelten Sepsis-Tieren. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass Melatonin einen Einfluss auf die kardiovaskuläre Regulation hat. So konnte gezeigt werden, dass Melatonin das kardiale Schlagvolumen erhöht [123] oder über die Beeinflussung der Autoregulation von Gefäßen zu einer Veränderung des Blutflusses in Organen und Geweben führen kann [53, 124]. Dieser durchblutungsregulierende Effekt scheint über spezifische Melatoninrezeptoren, die in den Blutgefäßen vorhanden sind [125], vermittelt zu werden. Eine Stimulation von Melatoninrezeptoren kann den Gefäßtonus regulieren [89]. Dabei sind Melatoninrezeptoren nicht in allen Gefäßen vorhanden [126], wodurch die Regulation des Gefäßsystems auf spezifische Bereiche beschränkt wird [127]. Auch die Auswirkungen der Stimulation von Melatoninrezeptoren im Gefäßsystem sind sehr vielfältig. Lew et al zeigte, dass Melatonin schwache vasokonstriktorische Effekte auf Schwanzarterien von Ratten ausübt [128]. Während bei jungen Ratten nach Melatoningabe ein Vasokonstriktion zu beobachten war, blieb diese bei älteren Ratten aus. Weiter scheint die Auswirkung der Melatoninrezeptor Stimulation von der Lokalisation der Gefäße und der Spezies abhängig zu sein. So führte eine Aktivierung von Melatoninrezeptoren in zerebralen Arterien der Ratte zur Vasokonstriktion [129], wohingegen die Stimulation von Melatoninrezeptoren in Schweinearterien zu einer Relaxation der glatten Muskulatur und damit zu einer Vasodilatation führte [130]. Zusätzlich scheint die gefäßregulierende Wirkung von Melatonin durch vorangegangene Medikamentengaben beeinflussbar zu sein. In Koronararterien von Schweinen konnte Melatonin eine NO induzierte Vasodilatation verringern [127], sowie in der Aorta von Ratten, eine KCl und Serotonin induzierte Vasokonstriktion inhibieren [131] oder sogar eine Vasodilatation durch Nitroglycerin potenzieren [132]. Wu et al



konnten zeigen, dass eine Melatonin-Gabe einen positiven Effekt auf die Aufrechterhaltung des Blutdrucks nach CLP induziertem septischem Schock bei der Ratte hat. Hier konnte Melatonin die mit Sepsis assoziierte Hyporeaktivität des Gefäßsystems auf Norepinephrin reduzieren und eine Hypotension verzögern [61]. Früher wurden der Stimulation von MT2 Rezeptoren, die auch in menschlichen Koronararterien nachgewiesen werden konnten und deren Expression bei kardiovaskulären Erkrankungen verringert ist [133], ausschließlich vasodilatatorische Eigenschaften zugeschrieben [87, 118]. Die Stimulation eines anderen Melatoninrezeptors sollte zu einer Vasokonstriktion führen [87]. Eine Möglichkeit wäre der MT1 Rezeptor [134]. In einer Studie von Tunstall und Kollegen konnten jedoch in Schweine-Koronararterien weder MT1 noch MT3 Rezeptoren nachgewiesen werden, wohl aber strukturelle und funktionelle MT2 Rezeptoren [127]. Die Stimulation dieser MT2 Rezeptoren konnte eine NO induzierte Vasodilatation verringern, indem ein durch NO induzierter Anstieg von zyklischem GMP inhibiert wurde. Dieser Effekt war durch Luzindole antagonisierbar [127]. Interessanterweise ist NO stark involviert in Hypotension und Gefäßhypereagibilität, die mit Sepsis und Endotoxin verursachtem Kreislaufversagen assoziiert sind [135, 136]. Melatonin scheint somit regulierend in das kardiovaskuläre System einzugreifen, falls es dort zu einer Dysbalance kommt. Solche Dysbalancen treten zum Beispiel auch bei der Sepsis oder dem hämorrhagischem Schock auf. In einer Arbeit von Mathes und Kollegen konnte gezeigt werden, dass der Melatoninrezeptor-Agonist Ramelteon, der eine starke Affinität zu den Melatoninrezeptoren MT1 und MT2 aufweist [99], zu einer Verbesserung der Leberfunktion und Leberperfusion nach hämorrhagischem Schock führt [78]. Zusätzlich konnten diese scheinbar Rezeptor vermittelte, durchblutungsregulierende Effekte von Melatonin und Ramelteon durch Luzindole antagonisiert werden [78]. Melatonin scheint also über die Stimulation von Melatoninrezeptoren in der Lage zu sein, eine kardiovaskuläre Dekompensation zu verzögern [61]. Gleichzeitig wird jedoch auch eine Perfusion lebenswichtiger Organe gewährleistet [78]. Dies könnte somit ein möglicher Erklärungsansatz für die protektiven Eigenschaften von Melatonin und Ramelteon bezüglich der Verlängerung der Überlebenszeit nach polymikrobieller Sepsis sein.

Um den Einfluss von Melatonin und Ramelteon auf die kardiovaskuläre Regulation genauer zu untersuchen, wäre die Messung des Herzzeitvolumens und des Gefäßwiderstands ein geeigneter Untersuchungsansatz, was in der vorliegenden Studie nicht erfolgte.

Die genauen Mechanismen, wie Melatonin in die Autoregulation des Gefäßsystems Einfluss nimmt, sind aktuell jedoch noch nicht vollständig geklärt. Weitere Studien werden nötig sein, um diesen Prozess genauer zu verstehen.

### **7.1.3 Blutgasanalyse**

Mit Hilfe von BE (Base Excess), Laktat und pH-Wert lassen sich Dysfunktionen im Organismus aufzeigen, die eng mit der Sepsis assoziierten Mortalität korrelieren [137]. Eine Verbesserung der azidotischen Stoffwechsellage kann zu einer schnelleren Gesundung von Patienten beitragen [138], da zum Beispiel das Immunsystem bei niedrigen pH-Werten unter schwerer Azidose bei der Erfüllung seiner physiologischen Aufgaben gehemmt ist [138]. Auch für die Funktionstüchtigkeit lebenswichtiger Organe ist ein pH im Normbereich wichtig [139]. Aus den gewonnenen Daten der Blutgasanalyse lässt sich ersehen, dass bei allen Versuchsgruppen die Ausgangswerte im Normbereich liegen. Bei allen CLI Tieren zeigt sich ein Abfall vom pH-Wert und vom BE während des Beobachtungszeitraums. Dies wurde auch für unbehandelte Tiere nach CLI durch Scheiermann und Kollegen beschrieben [113]. Bei den mit Melatonin und Ramelteon behandelten Sepsis Gruppen kommt es zu einem signifikant langsameren Abfall des pH-Wertes und des BE, verglichen mit den unbehandelten Sepsis Tieren. Wu und Kollegen konnten zeigen, dass es nach 18 h CLP Sepsis keinen signifikanten Unterschied für den pH-Wert zwischen septischen und unbehandelten Tieren gab [61], wohl aber der BE nach 18 h einen signifikanten Abfall zeigte. Dieser Abfall konnte durch eine wiederholte Gabe von 3 mg/kg des pinealen Hormons nach 3, 6 und 12 Stunden abgeschwächt werden [61]. In dem vorliegenden CLI-Modell kommt es zu einer stärkeren Beeinflussung der Blutgasparameter. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, weshalb sich bei unseren Ergebnissen ein deutlicherer positiver Einfluss von Melatonin und Ramelteon auf die Stabilisierung der

Blutgasparameter, verglichen mit den oben genannten CLP oder den hämorrhagischen Schock- Modellen, zeigte.

Zu einer Azidose kann es im Rahmen einer Sepsis trotz ausreichendem Sauerstoffangebot kommen. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zur Hemmung der Atmungskette, woraus eine verminderte ATP-Bildung resultiert [140]. Um weiterhin ATP zur Verfügung stellen zu können, wird Glukose vermehrt anaerob abgebaut, was schließlich zu einem Laktatanstieg führt. Bei Entzündungsreaktionen werden Mitochondrien frühzeitig geschädigt [141, 142, 143]. Dabei spielt die NO-Produktion durch i-mtNOS (induzierbare mitochondriale NO-Synthase) eine entscheidende Rolle während der Sepsis [144, 145, 146]. Melatonin ist in der Lage die mitochondriale ATP-Produktion nach CLP Sepsis bei Mäusen wieder herzustellen [147]. Ferner kann das pineale Hormon die Ausbildung und Aktivität von zyklischem i-NOS (induzierbare NO-Synthase) und mitochondrialem i-mtNOS bei septischen Ratten und Mäusen hemmen [145, 148, 149]. Nach CLP bei Mäusen mit intakter NO-Synthase, konnte Melatonin die mitochondriale Funktion normalisieren und damit die ATP-Produktion steigern, was mit einer Verlängerung des Überlebens der septischen Tiere assoziiert war [150]. Die signifikante Verbesserung des Säure-Basenhaushaltes unserer Studie geht einher mit einer Verlängerung der Überlebensrate und Überlebenszeit. Auch hier war dieser Effekt vollständig durch Luzindole antagonisierbar. Die positiven Einflüsse auf den Säure-Basenhaushalt, wie sie hier beobachtet wurden, könnten somit ebenfalls rezeptorvermittelt sein. In der protektiven Wirkung auf die Mitochondrien über eine Hemmung der NO-Synthase und damit verbundenen Steigerung des ATP-Angebotes, könnte ein möglicher Weg in der Vermittlung der protektiven Eigenschaften von Melatonin bezüglich des Säure-Basenhaushaltes während einer Sepsis sein. Bisher gibt es nur wenig vergleichbare Daten über die Auswirkungen von Melatonin, Ramelteon und Luzindole auf den pH-Wert, den Laktat-Wert und den BE unter Sepsis. Weitere Studien sind erforderlich, um diesen Mechanismus zu untersuchen und verstehen zu können.

### 7.1.4 Zytokine

Im Verlauf des Versuchs wurden die Plasmakonzentrationen der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$ , sowie des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 gemessen. Die Messungen der Zytokinplasmakonzentrationen erfolgte nativ und nach Stimulation durch LPS im Vollblutansatz. Die Zytokinuntersuchung wurde zu zwei Zeitpunkten durchgeführt. Zum Zeitpunkt (T0) (Referenzwert) direkt vor Sepsisinduktion und (T1) 5 Stunden danach.

#### 7.1.4.1 Unstimulierte Zytokinantwort

Für die unstimulierten Zytokine konnten zum Zeitpunkt T0 nur geringe Plasmakonzentrationen, dicht an der Nachweisgrenze des ELISA's, beobachtet werden. Zum Zeitpunkt T1 zeigte sich bei den Sepsis Tieren ein signifikanter Anstieg aller Zytokinplasmaspiegel.

Zum Zeitpunkt T1 deutet sich für die proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-6 in den Therapiegruppen mit Melatonin und Reamelteon ein Trend zu erniedrigten Zytokinkonzentrationen im Vergleich zu allen anderen Sepsisgruppen ab. Dies überschritt jedoch nicht das Signifikanzniveau, was durch die geringe Fallzahl und die großen Standardabweichungen der Zytokin-Plasmakonzentrationen erklärt werden kann. Nach zusätzlicher Gabe von Luzindole zeigte sich nach 5 h Sepsis eine signifikant erniedrigte Plasmakonzentration von TNF- $\alpha$ . Eine mögliche Erklärung hierfür könnte das hohe antioxidative Potential von Melatonin [54, 64, 65] und Luzindole [103] sein. In der gegenwärtigen Literatur finden sich gegensätzliche Daten, was den Einfluss von Melatonin auf die Zytokinproduktion betrifft. In der Mehrzahl der Studien zeigt sich eine Reduktion der proinflammatorischen Zytokine wie TNF- $\alpha$ , Interleukin IL-1, IL-1 $\beta$  und IL-6 durch Melatonin. Diese antiinflammatorische Eigenschaft lies sich an Modellen der Sepsis, der ischämischen Reperfusion, sowie nach Gabe der toxischen Substanzen Carbon Tetrachloride und Dimethylnitrosamine [59, 61, 151, 152, 153, 154, 155] nachweisen. In der Arbeit von Wu und Kollegen besteht die schützende Wirkung von Melatonin vor LPS induzierter Endotoxämie unter Anderem darin, die zirkulierenden TNF- $\alpha$  Spiegel zu senken [59]. In der vorliegenden Arbeit war dieser Trend erkennbar, jedoch ohne statistische Signifikanz. Wu und Mitarbeiter induzierten eine

Endotoxinämie durch eine Injektion von bakteriellen Lipopolysachariden (LPS), nicht durch CLI. Die CLI-Sepsis ist der LPS induzierten schweren Endotoxämie bei der Ratte ähnlich [156]. Dennoch erlauben Studien, welche eine isolierte LPS Gabe untersuchen, lediglich die Betrachtung einer spezifischen Ursachen-Wirkungsbeziehung, d.h. die dadurch gewonnen Ergebnisse sind sehr viel eingeschränkter interpretierbar. Die innerhalb des Organismus ablaufenden Wechselwirkungen mit verschiedenen Erregern werden bei solchen Modellen nicht ausreichend berücksichtigt. Mit Hilfe des CLI-Modells nach Scheiermann, das die klinischen Kriterien einer Sepsis mehr imitiert, als das LPS Modell [113], ist in Bezug auf meine Untersuchungskriterien eine globalere und auch realistischere Betrachtungsweise möglich. Die Vielzahl der pathogenen Erreger, die freigesetzt werden, spielen bei der Ausschüttung der Zytokine eine entscheidende Rolle. Die Stimulation des Immunsystems durch ausschließlich gramnegative Bakterien führt zu höheren TNF- $\alpha$  Konzentrationen, als die Stimulation durch ausschließlich grampositive Erreger oder gemischte Infektionen [157].

Carillo-Vico und Kollegen konnten an Schweizer Mäusen zeigen, dass nach intraperitonealer Gabe von (10mg/kg/KG) Melatonin, 30 min vor und 1 Stunde nach einer i.p. LPS Injektion (jeweils 0,75mg/Tier) ein verlängertes Überleben im Vergleich zu unbehandelten Tieren beobachtet wurde. Dieser protektive Effekt wurde dabei unter anderem der Modulation der Freisetzung pro- und anti-inflammatorischer Zytokine angerechnet. Die Melatoningabe wirkte teilweise dem Anstieg der LPS induzierten proinflammatorischen Zytokinspiegel wie TNF- $\alpha$ , IL-12 und Interferon-Gamma in dem lokalen Injektionsbereich entgegen. Die Reduktion der proinflammatorischen Zytokine war auch hier auf systemischer Ebene statistisch nicht signifikant. Unter Betrachtung der antiinflammatorischen IL-10 Spiegel, 6 h nach LPS induzierter Endotoxinämie, zeigte sich ein Anstieg bei den mit Melatonin behandelten Tieren auf lokaler und auf systemischer Ebene [65]. Die vermehrte systemische Ausschüttung von IL-10 zeigte sich auch in unserer Studie. Die IL-10 Spiegel waren bei allen Sepsis Tieren massiv erhöht, jedoch unabhängig von der medikamentösen Therapie.

Eine weitere Studie von Yavuz et al zeigte ähnlich Ergebnisse nach Candida Sepsis bei der Ratte. Hier zeigte sich ein nicht signifikanter Trend zu erniedrigten TNF- $\alpha$

Spiegeln nach Melatoningabe, wobei der IL-6 Spiegel Anstieg durch Melatonin signifikant abgeschwächt wurde [67]. Im Gegensatz dazu konnten Maestroni und Kollegen keinen Effekt von Melatonin auf diese proinflammatorischen Zytokine nach LPS-induzierter Endotoxämie bei Mäusen feststellen [57]. Auch bei drei weiteren in vitro Studien, hatte Melatonin keinen Einfluss auf die LPS stimulierte Freisetzung von TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-1 $\beta$  oder IL-6 in Monozyten oder Makrophagen [91, 158, 159]. Die Ergebnisse müssen vor dem Hintergrund des jeweiligen Studiendesigns gedeutet werden. Probleme im Vergleich der Daten liegen zum Beispiel bei verschiedenen Messzeitpunkten, Methoden und Zytokininduktoren. Außerdem besitzen Zytokine kurze Halbwertszeiten. Hinzu kommt ein interindividueller Unterschied in der Zytokinexpression bei genetischem Polymorphismus [160, 161, 162].

### **7.1.4.2 Stimulierte Zytokinantwort**

Die immunsuppressive Phase, die zeitlich nach einem septischen Ereignis auftritt, macht den Organismus anfällig für eine Zweitinfektion [13]. Das MODS kann im Verlauf einer Sepsis eine tödliche Komplikation darstellen. Für die Entwicklung des MODS ist ein second hit, beispielsweise verursacht durch bakterielle Zweitinfektion, von entscheidender Bedeutung [163]. Eine adequate Reaktionsfähigkeit von mononukleären Zellen des peripheren Blutes auf einen second hit würde dementsprechend für eine bessere Prognose sprechen. Die vorliegenden Ergebnisse der stimulierten Zytokinspiegel der Sham-Gruppen zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Referenzwerten und den Werten zum Zeitpunkt T1. Lediglich für die stimulierten IL-6 Spiegel zum Zeitpunkt T1 zeigten sich bei den Sham-Tieren signifikant höhere Werte, verglichen mit den zugehörigen Referenzwerten. Auch beim Menschen konnten nach elektiven operativen Eingriffen erhöhte IL-6 Werte gemessen werden [23], was für eine normale proinflammatorische Reaktion mit Aktivierung von mononukleären Zellen im Rahmen des operativen Eingriffs spricht. Im Vergleich zu den Ausgangswerten waren nach 5 h CLI, unabhängig von der Studienmedikation, die stimulierten TNF- $\alpha$  Plasmaspiegel massiv unterdrückt. Dies deutet auf eine schlechtere Reagibilität mononukleärer Zellen hin, da es nach LPS Gabe im Vollblutansatz zu einer

70

maximalen ex-vivo Zytokinfreisetzung kommt [110, 111]. Auch bei Patienten mit schwerer Sepsis zeigen sich die stimulierten TNF- $\alpha$  Konzentrationen im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen unterdrückt, was bis zu zehn Tage nach Studienbeginn anhielt [111]. Borgermann und Kollegen zeigten ähnliche Ergebnisse nach operativen Eingriffen. Hier waren die stimulierten TNF- $\alpha$  Spiegel noch sechs Tage nach dem Eingriff signifikant niedriger als die Ausgangswerte [164]. Auch bei polytraumatisierten Patienten zeigte sich eine Unterdrückung der mit LPS stimulierten proinflammatorischen Zytokinantwort [165]. Im Gegensatz zu den TNF- $\alpha$  Plasmakonzentrationen, zeigten sich die Plasmakonzentrationen von IL-10, im Vergleich zu den Ausgangswerten, deutlich erhöht. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass IL-10 im Verlauf der Akute-Phase-Reaktion zeitlich nach TNF- $\alpha$  ausgeschüttet wird und mit seiner Freisetzung auch die Bildung und Ausschüttung von TNF- $\alpha$  hemmt [28]. Die verminderte Stimulierbarkeit von TNF- $\alpha$ , einem der wichtigsten Zytokine in der Immunabwehr, könnte auf eine Einschränkung des körpereigenen Abwehrmechanismus deuten.

In der vorliegenden Untersuchung zeigt sich ein Trend hin zu einer erhöhten IL-6 Konzentration nach der zusätzlichen Gabe von Luzindole bei septischen Tieren im Vergleich zu scheinoperierten Tieren. Dies war auch nach alleiniger Gabe von Luzindole statistisch signifikant. Wobei die Interpretation dieser Ergebnisse schwierig ist.

Aus den Daten der oben genannten Arbeiten lässt sich schließen, dass Melatonin, wenn überhaupt, einen diskreten Einfluss auf den proinflammatorischen Signalweg nach Sepsis hat. Nach unserem Wissen gibt es keine veröffentlichten Daten über den Einfluss von Ramelteon auf die Zytokinfreisetzung nach polymikrobieller Sepsis der Ratte. Basierend auf den Ergebnissen dieser Untersuchung könnte man schlussfolgern, dass sowohl Melatonin, als auch der selektive Melatoninrezeptor Agonist Ramelteon, keinen signifikanten Einfluss auf die pro- oder antiinflammatorischen Zytokinplasmaspiegel unter CLI-Sepsis der Ratte haben. Dagegen scheint die Gabe von Luzindole zu einer Reduktion der unstimulierten TNF- $\alpha$  Spiegel und zu höheren stimulierbaren IL-6 Werten bei der polymikrobiellen Sepsis der Ratte zu führen. Dies geht jedoch nicht einher mit einer Verbesserung der Vitalparameter oder der Überlebenszeit.

## 8 Schlussfolgerung

Eine Aktivierung von Melatoninrezeptoren durch das pineale Hormon Melatonin oder den Melatoninrezeptor-Agonisten Ramelteon führen zu einer verlängerten Überlebenszeit nach polymikrobieller Sepsis bei der Ratte. Hierbei zeigt sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Verlängerung der Überlebenszeit zwischen den beiden Substanzen. Weiter zeigt sich nach der Gabe von Melatonin und Ramelteon eine signifikant geringere Veränderung des pH-Wertes, des Base Excess und des Laktat-Wertes, sowie eine Stabilisierung der Hämodynamik.

Der Melatoninrezeptor-Antagonist, Luzindole, hebt alle diese protektiven Effekte einer Melatonin und Ramelteon Therapie auf. Demzufolge scheint die Stimulation von Melatoninrezeptoren eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung der protektiven Eigenschaften des Pineal Hormons in der Pathogenese des septischen Schocks zu spielen. Diese beobachtete Protektion scheint nicht maßgeblich von immunmodulatorischen Vorgängen beeinflusst zu sein.

Die Aktivierung von Melatoninrezeptoren stellt somit ein potentielles Therapiekonzept bei der Behandlung der Sepsis dar. Der Mechanismus, über den Melatonin und Ramelteon ihre protektiven Eigenschaften bei der Sepsis vermitteln, muss weiterhin untersucht werden.



## 9 Literaturverzeichnis

1. Brunkhorst FM (2006) *[Epidemiology, economy and practice -- results of the German study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet)]*. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* **41**: 43-4
2. Reinhart K, et al. *Prevention, diagnosis, therapy and follow-up care of sepsis: 1st revision of S-2k guidelines of the German Sepsis Society (Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG)) and the German Interdisciplinary Association of Intensive Care and Emergency Medicine (Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI))*. *Ger Med Sci* **8**: Doc14
3. Reinhart K, et al. (2006) *[Diagnosis and therapy of sepsis: guidelines of the German Sepsis Society Inc. and the German Interdisciplinary Society for Intensive and Emergency Medicine]*. *Anaesthesist* **55 Suppl 1**: 43-56
4. Levy MM, et al. (2003) *2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference*. *Crit Care Med* **31**: 1250-6
5. Dellinger RP, et al. (2004) *Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock*. *Crit Care Med* **32**: 858-73
6. Martin GS, et al. (2003) *The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000*. *N Engl J Med* **348**: 1546-54
7. Bates DW, et al. (1990) *Predicting bacteremia in hospitalized patients. A prospectively validated model*. *Ann Intern Med* **113**: 495-500
8. Bates DW, et al. (1997) *Predicting bacteremia in patients with sepsis syndrome. Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group*. *J Infect Dis* **176**: 1538-51
9. Crowe M, et al. (1998) *Bacteraemia in the adult intensive care unit of a teaching hospital in Nottingham, UK, 1985-1996*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **17**: 377-84
10. Leibovici L, et al. (1991) *Bacteremia in febrile patients. A clinical model for diagnosis*. *Arch Intern Med* **151**: 1801-6
11. Hotchkiss RS, Karl IE (2003) *The pathophysiology and treatment of sepsis*. *N Engl J Med* **348**: 138-50
12. Löffler P, Heinrich *Biochemie und Pathobiochemie* ed. 8-Auflage. 2007 Springer.

13. Muenzer JT, et al. *Characterization and modulation of the immunosuppressive phase of sepsis*. Infect Immun **78**: 1582-92
14. Cavaillon JM, et al. (2003) *Cytokine cascade in sepsis*. Scand J Infect Dis **35**: 535-44
15. Spits H, de Waal Malefyt R (1992) *Functional characterization of human IL-10*. Int Arch Allergy Immunol **99**: 8-15
16. Pinsky MR, et al. (1993) *Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality*. Chest **103**: 565-75
17. Echtenacher B, et al. (1990) *Requirement of endogenous tumor necrosis factor/cachectin for recovery from experimental peritonitis*. J Immunol **145**: 3762-6
18. Tracey KJ, et al. (1986) *Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin*. Science **234**: 470-4
19. Tracey KJ, Cerami A (1993) *Tumor necrosis factor: an updated review of its biology*. Crit Care Med **21**: S415-22
20. Tovey MG (1988) *The expression of cytokines in the organs of normal individuals: role in homeostasis. A review*. J Biol Regul Homeost Agents **2**: 87-92
21. Gebhard F, et al. (2000) *Is interleukin 6 an early marker of injury severity following major trauma in humans?* Arch Surg **135**: 291-5
22. Terregino CA, et al. (2000) *Endogenous mediators in emergency department patients with presumed sepsis: are levels associated with progression to severe sepsis and death?* Ann Emerg Med **35**: 26-34
23. Biffl WL, et al. (1996) *Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation?* Ann Surg **224**: 647-64
24. Szabo G, Kodys K, Miller-Graziano CL (1991) *Elevated monocyte interleukin-6 (IL-6) production in immunosuppressed trauma patients. I. Role of Fc gamma RI cross-linking stimulation*. J Clin Immunol **11**: 326-35
25. Fischer CP (2006) *Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance?* Exerc Immunol Rev **12**: 6-33
26. Spittler A, et al. (2000) *Relationship between interleukin-6 plasma concentration in patients with sepsis, monocyte phenotype, monocyte phagocytic properties, and cytokine production*. Clin Infect Dis **31**: 1338-42
27. Grutz G (2005) *New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression*. J Leukoc Biol **77**: 3-15

28. de Waal Malefyt R, et al. (1991) *Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes.* J Exp Med **174**: 1209-20
29. Moore KW, et al. (2001) *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor.* Annu Rev Immunol **19**: 683-765
30. Cassatella MA, et al. (1994) *Interleukin 10 (IL-10) upregulates IL-1 receptor antagonist production from lipopolysaccharide-stimulated human polymorphonuclear leukocytes by delaying mRNA degradation.* J Exp Med **179**: 1695-9
31. Thompson-Snipes L, et al. (1991) *Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors.* J Exp Med **173**: 507-10
32. Groux H, et al. (1998) *Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells.* J Immunol **160**: 3188-93
33. Hopkins RO, et al. (1999) *Neuropsychological sequelae and impaired health status in survivors of severe acute respiratory distress syndrome.* Am J Respir Crit Care Med **160**: 50-6
34. Aerzteblatt D (25.10.2011) *Sepsis-Medikament Xigris vom Markt genommen.* <http://www.aerzteblatt.de/nachrichten/47819/Sepsis-Medikament-Xigris-vom-Markt-genommen>
35. Srinivasan V, et al. *Melatonin in septic shock: Some recent concepts.* J Crit Care **25**: 656 e1-6
36. Reiter RJ, et al. (2007) *Medical implications of melatonin: receptor-mediated and receptor-independent actions.* Adv Med Sci **52**: 11-28
37. Pandi-Perumal SR, et al. (2006) *Melatonin: Nature's most versatile biological signal?* Febs J **273**: 2813-38
38. Wichmann MW, et al. (1996) *Increased melatonin levels after hemorrhagic shock in male and female C3H/HeN mice.* Experientia **52**: 587-90
39. Lynch HJ, Eng JP, Wurtman RJ (1973) *Control of pineal indole biosynthesis by changes in sympathetic tone caused by factors other than environmental lighting.* Proc Natl Acad Sci U S A **70**: 1704-7
40. Tannenbaum MG, et al. (1989) *Pineal sensitivity to nighttime swimming stress changes during the active season in Richardson's ground squirrels (Spermophilus richardsonii).* J Exp Zool **250**: 298-303

41. Olofsson K, et al. (2004) *Abolished circadian rhythm of melatonin secretion in sedated and artificially ventilated intensive care patients*. Acta Anaesthesiol Scand **48**: 679-84
42. Mundigler G, et al. (2002) *Impaired circadian rhythm of melatonin secretion in sedated critically ill patients with severe sepsis*. Crit Care Med **30**: 536-40
43. Miyazaki T, et al. (2003) *Correlation between serum melatonin circadian rhythm and intensive care unit psychosis after thoracic esophagectomy*. Surgery **133**: 662-8
44. Shigeta H, et al. (2001) *Postoperative delirium and melatonin levels in elderly patients*. Am J Surg **182**: 449-54
45. Carrillo-Vico A, et al. (2004) *Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance*. FASEB J **18**: 537-9
46. Conti A, et al. (2000) *Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells*. J Pineal Res **28**: 193-202
47. Srinivasan V, et al. (2008) *Immunomodulation by melatonin: its significance for seasonally occurring diseases*. Neuroimmunomodulation **15**: 93-101
48. Bubenik GA (2002) *Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance*. Dig Dis Sci **47**: 2336-48
49. Slominski A, et al. (2008) *Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions*. Trends Endocrinol Metab **19**: 17-24
50. Champier J, et al. (1997) *Evidence for tryptophan hydroxylase and hydroxy-indol-O-methyl-transferase mRNAs in human blood platelets*. Life Sci **60**: 2191-7
51. Tijmes M, Pedraza R, Valladares L (1996) *Melatonin in the rat testis: evidence for local synthesis*. Steroids **61**: 65-8
52. Tosini G, Menaker M (1998) *The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration*. Brain Res **789**: 221-8
53. Pandi-Perumal SR, et al. (2008) *Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways*. Prog Neurobiol **85**: 335-53
54. Sewerynek E, et al. (1995) *Melatonin administration prevents lipopolysaccharide-induced oxidative damage in phenobarbital-treated animals*. J Cell Biochem **58**: 436-44

55. Sewerynek E, et al. (1996) *Lipopolysaccharide-induced DNA damage is greatly reduced in rats treated with the pineal hormone melatonin*. Mol Cell Endocrinol **117**: 183-8
56. Sewerynek E, et al. (1995) *Melatonin reduces both basal and bacterial lipopolysaccharide-induced lipid peroxidation in vitro*. Free Radic Biol Med **19**: 903-9
57. Maestroni GJ (1996) *Melatonin as a therapeutic agent in experimental endotoxic shock*. J Pineal Res **20**: 84-9
58. Wichmann MW, et al. (1996) *Melatonin administration following hemorrhagic shock decreases mortality from subsequent septic challenge*. J Surg Res **65**: 109-14
59. Wu CC, et al. (2001) *Melatonin prevents endotoxin-induced circulatory failure in rats*. J Pineal Res **30**: 147-56
60. Reynolds FD, et al. (2003) *The pineal gland hormone melatonin improves survival in a rat model of sepsis/shock induced by zymosan A*. Surgery **134**: 474-9
61. Wu JY, et al. (2008) *Therapeutic effects of melatonin on peritonitis-induced septic shock with multiple organ dysfunction syndrome in rats*. J Pineal Res **45**: 106-16
62. Paskaloglu K, et al. (2004) *Melatonin treatment protects against sepsis-induced functional and biochemical changes in rat ileum and urinary bladder*. Life Sci **74**: 1093-104
63. Sener G, et al. (2005) *Melatonin protects against oxidative organ injury in a rat model of sepsis*. Surg Today **35**: 52-9
64. Reiter RJ, et al. (2009) *Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin*. Crit Rev Biochem Mol Biol **44**: 175-200
65. Carrillo-Vico A, et al. (2005) *Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects*. J Pineal Res **39**: 400-8
66. Ben-Nathan D, et al. (1995) *Protective effects of melatonin in mice infected with encephalitis viruses*. Arch Virol **140**: 223-30
67. Yavuz T, et al. (2007) *Effects of melatonin on Candida sepsis in an experimental rat model*. Adv Ther **24**: 91-100
68. Santello FH, et al. (2008) *Suppressive action of melatonin on the TH-2 immune response in rats infected with Trypanosoma cruzi*. J Pineal Res **45**: 291-6

69. Poeggeler B, et al. (1994) *Melatonin--a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro*. Ann N Y Acad Sci **738**: 419-20
70. Hardeland R (2005) *Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance*. Endocrine **27**: 119-30
71. Tan DX, et al. (1998) *A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation*. Biochem Biophys Res Commun **253**: 614-20
72. Pieri C, et al. (1994) *Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E*. Life Sci **55**: PL271-6
73. Cagnoli CM, et al. (1995) *Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis*. J Pineal Res **18**: 222-6
74. Tan DX, et al. (2001) *N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant*. Faseb J **15**: 2294-6
75. Guenther AL, et al. (2005) *Reactions of the melatonin metabolite AMK (N1-acetyl-5-methoxykynuramine) with reactive nitrogen species: formation of novel compounds, 3-acetamidomethyl-6-methoxycinnolinone and 3-nitro-AMK*. J Pineal Res **39**: 251-60
76. Tan DX, et al. (2007) *One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species?* J Pineal Res **42**: 28-42
77. Mathes AM *Hepatoprotective actions of melatonin: possible mediation by melatonin receptors*. World J Gastroenterol **16**: 6087-97
78. Mathes AM, et al. (2008) *Selective activation of melatonin receptors with ramelteon improves liver function and hepatic perfusion after hemorrhagic shock in rat*. Crit Care Med **36**: 2863-70
79. Rodriguez C, et al. (2004) *Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin*. J Pineal Res **36**: 1-9
80. Tomas-Zapico C, Coto-Montes A (2005) *A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes*. J Pineal Res **39**: 99-104
81. Dubocovich ML, et al. (2003) *Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors*. Front Biosci **8**: d1093-108
82. Nosjean O, et al. (2000) *Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2*. J Biol Chem **275**: 31311-7

83. Jockers R, et al. (2008) *Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new?* Br J Pharmacol **154**: 1182-95
84. von Gall C, Stehle JH, Weaver DR (2002) *Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction*. Cell Tissue Res **309**: 151-62
85. New DC, Tsim ST, Wong YH (2003) *G protein-linked effector and second messenger systems involved in melatonin signal transduction*. Neurosignals **12**: 59-70
86. Barrett P, et al. (1999) *Melatonin receptors and signal transduction mechanisms*. Biol Signals Recept **8**: 6-14
87. Doolen S, et al. (1998) *Melatonin mediates two distinct responses in vascular smooth muscle*. Eur J Pharmacol **345**: 67-9
88. Ting KN, et al. (1997) *Studies on the vasoconstrictor action of melatonin and putative melatonin receptor ligands in the tail artery of juvenile Wistar rats*. Br J Pharmacol **122**: 1299-306
89. Viswanathan M, Laitinen JT, Saavedra JM (1990) *Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation*. Proc Natl Acad Sci U S A **87**: 6200-3
90. Lissoni P, et al. (1992) *Immunological effects of a single evening subcutaneous injection of low-dose interleukin-2 in association with the pineal hormone melatonin in advanced cancer patients*. J Biol Regul Homeost Agents **6**: 132-6
91. Barjavel MJ, et al. (1998) *Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes*. J Immunol **160**: 1191-7
92. Pan M, et al. (2006) *Melatonin ameliorates nonalcoholic fatty liver induced by high-fat diet in rats*. J Pineal Res **41**: 79-84
93. Liu F, Ng TB (2000) *Effect of pineal indoles on activities of the antioxidant defense enzymes superoxide dismutase, catalase, and glutathione reductase, and levels of reduced and oxidized glutathione in rat tissues*. Biochem Cell Biol **78**: 447-53
94. Zhang H, Akbar M, Kim HY (1999) *Melatonin: an endogenous negative modulator of 12-lipoxygenation in the rat pineal gland*. Biochem J **344 Pt 2**: 487-93
95. Pozo D, et al. (1997) *Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin*. J Cell Biochem **65**: 430-42
96. Pozo D, et al. (1994) *Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum*. Life Sci **55**: PL455-60

97. Gilad E, et al. (1998) *Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NFkappaB activation.* Faseb J **12**: 685-93
98. Cajochen C (2005) *TAK-375 Takeda.* Curr Opin Investig Drugs **6**: 114-21
99. Kato K, et al. (2005) *Neurochemical properties of ramelteon (TAK-375), a selective MT1/MT2 receptor agonist.* Neuropharmacology **48**: 301-10
100. Dubocovich ML (1988) *Luzindole (N-0774): a novel melatonin receptor antagonist.* J Pharmacol Exp Ther **246**: 902-10
101. Dubocovich ML, et al. (1998) *Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms.* FASEB J **12**: 1211-20
102. Browning C, et al. (2000) *Pharmacological characterization of human recombinant melatonin mt(1) and MT(2) receptors.* Br J Pharmacol **129**: 877-86
103. Mathes AM, Wolf B, Rensing H (2008) *Melatonin receptor antagonist luzindole is a powerful radical scavenger in vitro.* J Pineal Res **45**: 337-8
104. Lochner A, et al. (2006) *Short- and long-term effects of melatonin on myocardial post-ischemic recovery.* J Pineal Res **40**: 56-63
105. Rezzani R, et al. (2006) *Beneficial effects of melatonin in protecting against cyclosporine A-induced cardiotoxicity are receptor mediated.* J Pineal Res **41**: 288-95
106. Husson I, et al. (2002) *Melatonergic neuroprotection of the murine periventricular white matter against neonatal excitotoxic challenge.* Ann Neurol **51**: 82-92
107. Brzozowski T, et al. (2005) *Importance of the pineal gland, endogenous prostaglandins and sensory nerves in the gastroprotective actions of central and peripheral melatonin against stress-induced damage.* J Pineal Res **39**: 375-85
108. Mathes AM, et al. (2008) *Melatonin receptors mediate improvements of liver function but not of hepatic perfusion and integrity after hemorrhagic shock in rats.* Crit Care Med **36**: 24-9
109. Georges DAea (2002) *Evaluation of the Cytotoxicity Effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 Colon Tumor Cell Cultures.* Biological & Pharmaceutical Bulletin. Bd. 25, S. 1600–1603.
110. Mitov IG, et al. (1997) *Differential cytokine production in stimulated blood cultures from intensive care patients with bacterial infections.* Infection **25**: 206-12
111. Ertel W, et al. (1995) *Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients.* Blood **85**: 1341-7



112. Kreutz M, et al. (1997) *A comparative analysis of cytokine production and tolerance induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharides and Staphylococcus aureus in human monocytes*. Immunology **92**: 396-401
113. Scheiermann P, et al. (2009) *Cecal ligation and incision: an acute onset model of severe sepsis in rats*. J Surg Res **151**: 132-7
114. Wilson BM, et al. (1991) *A convenient human whole blood culture system for studying the regulation of tumour necrosis factor release by bacterial lipopolysaccharide*. J Immunol Methods **139**: 233-40
115. Kleinschmidt S, et al. (1998) *Proinflammatory cytokine gene expression in whole blood from patients undergoing coronary artery bypass surgery and its modulation by pentoxifylline*. Shock **9**: 12-20
116. Xia CM, et al. (2008) *Effects of melatonin on blood pressure in stress-induced hypertension in rats*. Clin Exp Pharmacol Physiol **35**: 1258-64
117. Song GH, et al. (2005) *Melatonin attenuates stress-induced defecation: lesson from a rat model of stress-induced gut dysfunction*. Neurogastroenterol Motil **17**: 744-50
118. Masana MI, et al. (2002) *MT(2) melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery*. J Pharmacol Exp Ther **302**: 1295-302
119. Mathes AM, et al. (2008) *Melatonin pretreatment improves liver function and hepatic perfusion after hemorrhagic shock*. Shock **29**: 112-8
120. Das A, et al. *The inhibition of apoptosis by melatonin in VSC4.1 motoneurons exposed to oxidative stress, glutamate excitotoxicity, or TNF-alpha toxicity involves membrane melatonin receptors*. J Pineal Res **48**: 157-69
121. Lahiri S, et al. (2009) *Melatonin protects against experimental reflux esophagitis*. J Pineal Res **46**: 207-13
122. Montilla P, et al. (2003) *Effect of melatonin on the oxidative stress in N1E-115 cells is not mediated by mt1 receptors*. J Physiol Biochem **59**: 263-8
123. Mei YA, et al. (2001) *Melatonin and its analogs potentiate the nifedipine-sensitive high-voltage-activated calcium current in the chick embryonic heart cells*. J Pineal Res **30**: 13-21
124. Krause DN, et al. (1999) *Melatonin and cardiovascular function*. Adv Exp Med Biol **460**: 299-310

125. Stankov B, et al. (1993) *Autoradiographic localization of putative melatonin receptors in the brains of two Old World primates: Cercopithecus aethiops and Papio ursinus*. Neuroscience **52**: 459-68
126. Mahle CD, et al. (1997) *Melatonin modulates vascular smooth muscle tone*. J Biol Rhythms **12**: 690-6
127. Tunstall RR, et al. *MT2 receptors mediate the inhibitory effects of melatonin on nitric oxide-induced relaxation of porcine isolated coronary arteries*. J Pharmacol Exp Ther **336**: 127-33
128. Lew MJ, Flanders S (1999) *Mechanisms of melatonin-induced vasoconstriction in the rat tail artery: a paradigm of weak vasoconstriction*. Br J Pharmacol **126**: 1408-18
129. Geary GG, Krause DN, Duckles SP (1997) *Melatonin directly constricts rat cerebral arteries through modulation of potassium channels*. Am J Physiol **273**: H1530-6
130. Ting N, et al. (2000) *Pharmacological studies on the inhibitory action of melatonin and putative melatonin analogues on porcine vascular smooth muscle*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **361**: 327-33
131. Weekley LB (1991) *Melatonin-induced relaxation of rat aorta: interaction with adrenergic agonists*. J Pineal Res **11**: 28-34
132. Satake N, Oe H, Shibata S (1991) *Vasorelaxing action of melatonin in rat isolated aorta; possible endothelium dependent relaxation*. Gen Pharmacol **22**: 1127-33
133. Ekmekcioglu C, et al. (2003) *The melatonin receptor subtype MT2 is present in the human cardiovascular system*. J Pineal Res **35**: 40-4
134. Dubocovich ML, Markowska M (2005) *Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals*. Endocrine **27**: 101-10
135. Thiemermann C (1994) *The role of the L-arginine: nitric oxide pathway in circulatory shock*. Adv Pharmacol **28**: 45-79
136. Szabo C (1995) *Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock*. New Horiz **3**: 2-32
137. Singh S, Evans TW (2006) *Organ dysfunction during sepsis*. Intensive Care Med **32**: 349-60
138. Kellum JA (2004) *Metabolic acidosis in patients with sepsis: epiphenomenon or part of the pathophysiology?* Crit Care Resusc **6**: 197-203
139. Kvarstein G, Mirtaheri P, Tonnessen TI (2003) *Detection of organ ischemia during hemorrhagic shock*. Acta Anaesthesiol Scand **47**: 675-86

140. Carreras MC, et al. (2004) *Nitric oxide, complex I, and the modulation of mitochondrial reactive species in biology and disease*. Mol Aspects Med **25**: 125-39
141. Brealey D, et al. (2002) *Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock*. Lancet **360**: 219-23
142. Callahan LA, Supinski GS (2005) *Sepsis induces diaphragm electron transport chain dysfunction and protein depletion*. Am J Respir Crit Care Med **172**: 861-8
143. Crouser ED (2004) *Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome*. Mitochondrion **4**: 729-41
144. Escames G, et al. (2006) *Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice*. J Pineal Res **40**: 71-8
145. Escames G, et al. (2003) *Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats*. Faseb J **17**: 932-4
146. Lopez LC, et al. (2006) *Identification of an inducible nitric oxide synthase in diaphragm mitochondria from septic mice: its relation with mitochondrial dysfunction and prevention by melatonin*. Int J Biochem Cell Biol **38**: 267-78
147. Lopez LC, et al. (2006) *Melatonin restores the mitochondrial production of ATP in septic mice*. Neuro Endocrinol Lett **27**: 623-30
148. Crespo E, et al. (1999) *Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats*. FASEB J **13**: 1537-46
149. Kobzik L, et al. (1995) *Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships*. Biochem Biophys Res Commun **211**: 375-81
150. Escames G, et al. (2007) *Attenuation of cardiac mitochondrial dysfunction by melatonin in septic mice*. FEBS J **274**: 2135-47
151. Rodriguez-Reynoso S, et al. (2001) *Effect of exogenous melatonin on hepatic energetic status during ischemia/reperfusion: possible role of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide*. J Surg Res **100**: 141-9
152. Li JY, et al. (2008) *Melatonin protects liver from intestine ischemia reperfusion injury in rats*. World J Gastroenterol **14**: 7392-6
153. Wang H, et al. (2005) *Melatonin ameliorates carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats via inhibition of oxidative stress*. Life Sci **77**: 1902-15

154. Jung KH, et al. (2009) *Melatonin downregulates nuclear erythroid 2-related factor 2 and nuclear factor-kappaB during prevention of oxidative liver injury in a dimethylnitrosamine model.* J Pineal Res **47**: 173-83
155. Baykal A, et al. (2000) *Melatonin modulates mesenteric blood flow and TNFalpha concentrations after lipopolysaccharide challenge.* Eur J Surg **166**: 722-7
156. Scheiermann P, et al. *Comparing hemodynamics, blood gas analyses and proinflammatory cytokines in endotoxemic and severely septic rats.* Int Immunopharmacol
157. Cohen J, Abraham E (1999) *Microbiologic findings and correlations with serum tumor necrosis factor-alpha in patients with severe sepsis and septic shock.* J Infect Dis **180**: 116-21
158. Williams JG, Bernstein S, Prager M (1998) *Effect of melatonin on activated macrophage TNF, IL-6, and reactive oxygen intermediates.* Shock **9**: 406-11
159. Shafer LL, McNulty JA, Young MR (2001) *Assessment of melatonin's ability to regulate cytokine production by macrophage and microglia cell types.* J Neuroimmunol **120**: 84-93
160. Yoon SZ, et al. (2009) *Association between tumor necrosis factor alpha 308G/A polymorphism and increased proinflammatory cytokine release after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass in the Korean population.* J Cardiothorac Vasc Anesth **23**: 646-50
161. Schroeder S, et al. (2003) *A tumor necrosis factor gene polymorphism influences the inflammatory response after cardiac operation.* Ann Thorac Surg **75**: 534-7
162. McGuire W, et al. (1994) *Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria.* Nature **371**: 508-10
163. Bone RC (1994) *Sepsis and its complications: the clinical problem.* Crit Care Med **22**: S8-11
164. Borgermann J, et al. (2002) *Tumor necrosis factor-alpha production in whole blood after cardiopulmonary bypass: downregulation caused by circulating cytokine-inhibitory activities.* J Thorac Cardiovasc Surg **124**: 608-17
165. Keel M, et al. (1996) *Endotoxin tolerance after severe injury and its regulatory mechanisms.* J Trauma **41**: 430-7; discussion 437-8

## 10 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Fink T, Glas M, Wolf A, Kleber A, Reus E, Wolff M, Kiefer D, Wolf B, Rensing H, Volk T, Mathes AM: Melatonin receptors mediate improvements of survival in a model of polymicrobial sepsis. Crit Care Med. 2014 Jan;42(1):e22-31

## 11 Dank

Selina Wolff für die Korrekturarbeiten und die Unterstützung.

Meiner gesamten Familie.

Thorsten Probst, der mich oft vor der Zerstörung des Laptop und Tränen bewahrt hat.

Dem gesamten Team vom Anästhesie-Labor.

Astrid Kleber für die hilfsbereite Unterstützung.

Beate Wolf als Beraterin für sämtliche Abläufe im Labor.

Tobias Fink für die unendlichen und konstruktiven Korrekturarbeiten.

Meinem Doktorvater Alexander Mathes.

Erik Reus für die Einweisung in die Laborarbeit.

Michaela Ruhnke für die Hilfe mit dem Endnote style.

Dank